

Tartu Ülikool
Loodus- ja tehnoloogiateaduskond
Ökoloogia ja Maateaduste Instituut
Botaanika õppetool

Hedi Pedajas

**PEREKONNA *CAREX* LIIKIDE ERISTATAVUS TAKSONOOMILISTEKS
SEKTSIOONIDEKS ISOENSÜÜMTUNNUSTE ALUSEL**

Magistritöö

Juhendaja: vanemteadur Tatjana Oja

Tartu 2015

0. Sisukord

1. Sissejuhatus	4
2. Uurimisobjekt ja eesmärgid	6
2.1 Perekonna <i>Carex</i> L. lühiiseloostus	6
2.1.1 Taksonoomia	6
2.1.2 Ökoloogia ja elukäigutunnused	9
2.1.3 Geneetika	10
2.1.4 Tarnade kasulikkus	12
2.2 Eesmärgid	13
3. Materjal ja metoodika	15
3.1 Taimne materjal	15
3.2 Isoensüümanalüüs	17
3.2.1 Teoreetiline taust	17
3.2.2 Laboritöö	18
3.3 Andmeanalüüs	21
3.3.1 GenAlEx, R (Tukey)	21
3.3.2 PAUP*, Figtree	21
4. Tulemused	23
4.1 Allo- ja heterosüümne varieeruvus	23
4.2 Liikide ja seksioonide statistiline eristumine isoensüümtunnuste alusel	25
4.2.1 Tukey HSD testi tulemused	25
4.2.2 Peakoordinaatanalüüsi (PcoA) tulemused	28
4.2.3 Molekulaarse varieeruvuse jaotumine (AMOVA)	34
4.3 Liikide ja seksioonide feneetiline ja kladistiline eristumine	35
5. Arutelu	40
5.1 Tunnustatud rühmade feneetiline eristumine	40
5.1.1 Liigisisene tase	40
5.1.2 Liikide tase	41
5.1.3 Seksioonide tase	41
5.1.4 Alamperekondade (klaadide) tase	43
5.2 Perekonna <i>Carex</i> fülogenees	44

5.2.1 Hinnang heuristilisele otsingule	44
5.2.2 Rõhuasetused alamperekonnas <i>Vignea</i>	44
5.2.3 Huvipunktid <i>CoreCarex</i> 'i klaadis	45
5.3 Töö käigus tekkinud tähelepanekud	46
5.4 Võrdlus DNA meetoditega ning hinnang isoensüümanalüüsile	46
6. Kokkuvõte	49
7. Summary	50
8. Tänuavaldused.....	52
9. Kasutatud kirjandus.....	52
10. Lisad	58
Lisa 1 – PAUP* käsufaili näidis	58
Lisa 2 – isoensüümalleelide sagedused sektsioonide ja liikide lõikes	59
Lisa 3 – UPGMA isendipuu.....	67
Lisa 4 – NJ isendipuu.....	71
Lisa 5 – Heuristilise otsingu isendipuu	75

1. Sissejuhatus

Erinevatel andmetel 1800-2100 liigi ning globaalse levikuga perekond tarn (*Carex*) pakub tänapäeval mitmetel põhjustel paljude bioloogiaharude teadlastele aktuaalset huvi. Looduskaitstajatele ja ökoloogidele on uurimisobjektiks perekonna mitmete esindajate dominantsusest tulenevad rollid niisketes kasvukohatüüpides (Leck ja Schütz, 2005; Kettenring ja Galatowitsch, 2007b, a; Waterway *et al.*, 2009; Noyce *et al.*, 2014); biokeemikud uurivad tarnade koostist farmaatsiatööstuse tarbeks vähi- ja muude ravimite toimeainete tuvastamise eesmärgil (Li *et al.*, 2009; Gonzalez-Sarrias *et al.*, 2011); biogeograafidele pakuvad huvi ebatavalised levikumustrid, kus taimerühma liigirikkuse tulipunkt asub troopika asemel parasvöötmes ning hoolimata pikamaaleviste puudumisest esineb bipolaarne areaal (Escudero *et al.*, 2010b; Escudero *et al.*, 2012b); geneetikud saavad tarnu kasutada mudeltaimena holotsentriliste kromosoomide ja nendega seotud mehhanismide uurimisel (Escudero *et al.*, 2010a; Escudero *et al.*, 2012b; Bures ja Zedek, 2014; Escudero *et al.*, 2015); taimefüsioloogidele pakub huvi tarnade võime keskkonnatingimustest olenevalt öisiku sugu valida (Heide, 2004).

Süsteematikud aga rakendavad erinevaid meetodeid, et tarnaliike piiritleda ja nimetada, nende ülikeerulist taksonoomiat, mitmekesisust ning evolutsiooni mõista (Judd *et al.*, 2002; Leveille-Bourret *et al.*, 2014; Yano *et al.*, 2014) ja sellega nii eelpool nimetatud kui ka kõigile teistele tarnu puudutavatele uuringutele raamistikku ja/või lähtepunkti pakkuda.

Kui veel mõnikümmend aastat tagasi põhines süstemaatika peamiselt fenotüübis väljenduvatel morfoloogilistel tunnustel, siis praeguseks on uute molekulaarsete meetodite ja andmetöötlusprogrammide plahvatuslik areng võimaldanud uuringutes kasutusele võtta väga informatiivsed DNA-markerid (Judd *et al.*, 2002; Waterway *et al.*, 2009). Nende kahe tunnusetüübi vaheastmeks võib pidada geneetilist varieeruvust otseselt arvutada võimaldavaid ent samal ajal ka fenotüübis väljenduvaid kodominantseid sõltumatuid isoensüümmarkereid (Wendel ja Weeden, 1989b).

Tarnaperekonna suur levila, maht ja taksonoomiline keerukus¹ (Waterway *et al.*, 2009) ning modernsete praimerite väljatöötamist nõudvate meetodite ressursikulukus on põhjustanud olukorra, kus põhjalikult uuritakse korraga vaid väikest, tavaliselt selgelt eristuvat (nt alamperekond *Vignea*, *core-Acrocystis* klaad (Roalson ja Friar, 2004b), *Siderostictae* (Yano *et al.*, 2014) ja teised) või väga keerukat (nt *C. flava* kompleks (Blackstock ja Ashton, 2010; Jimenez-Mejias *et al.*, 2012)) gruppi kogu perekonnast, mis on tihti veel geograafiliselt limiteeritud (Starr *et al.*, 2004; Waterway ja Starr, 2007; Starr ja Ford, 2009). Teine trend DNA-meetodite kasutajate puhul on hõlmata uuringus vaid üksikuid ja mitte tingimata rühma kõige paremini iseloomustavaid liike või isendeid vastavatest taksonitest ning saadud punkthinnanguid üldistades fülogeneesi kohta hüpoteese püstitada, nagu on 23 isendi põhjal teinud näiteks Escudero *et al.* (2010b) või 21 isendi põhjal Yano *et al.* (2014). Kuna on teada, et ajaloolistel põhjustel on paljud ka praegu kasutusel olevad rühmad (nii liigi kui sektsiooni tasemel) tarnaperekonnas para- või polüfüleetilised (Roalson ja Friar, 2004a; Waterway ja Starr, 2007; Escudero *et al.*, 2010b), ning nende sisene varieeruvus on suur ja põhjalikult kirjeldamata, ei tundu viimati kirjeldatud metoodika lõpuni usaldusväärne.

Seega oleks mõistlik kasutada varianti, kus kulukad DNA-meetodid saaks ka suuremahuliste süstemaatiliste analüüside esimestel etappidel asendada odavam, kiirema ja lihtsama isoensüümanalüüsiga (Micales ja Bonde, 1995). Käesoleva töö koostamiseni ei ole nii paljusid sektsioone ensüümtunnuste alusel võrdleva analüüsi kohta kirjanduses andmeid avaldatud, seega on uuring hetkel unikaalne.

¹ Waterway on perekonna keerukusele viidates 2009. aastal kirjutanud järgnevalt: „Caricea fülogeneesi täisrekonstruktsiooni loomine ei tundunud veel 10 aastat tagasi otstarbekas.“, mis ühtlasi selgitab, miks karikoloogid ehk tarnauurijad (tarnade uurimine ehk *caricology*) siiani täiesti teadlikult para- ja polüfüleetilisi rühmi ning vastavat nomenklatuuri kasutatavad.

2. Uurimisobjekt ja eesmärgid

2.1 Perekonna *Carex* L. lühiiseloostus

2.1.1 Taksonoomia

42,2 miljonit aastat tagasi lahknud (Escudero *et al.*, 2012b) perekond *Carex* oma ligikaudu 2000 liigiga kuulub üheiduleheliste hulka, lõikheinaliste (*Cyperaceae*) sugukonda, alamsugukonda *Caricoideae* ning koos perekondadega *Schoenoxiphium* Nees, *Kobresia* Willd., *Cymophyllus* Mack. ex Britton & A.Br. ja *Uncinia* Pers. monofüleetilisse triibusesse *Cariceae* (Waterway *et al.*, 2009; Escudero *et al.*, 2012b). *Carex* ise, maailma katteseemnetaimede perekondadest üks suurimaid, on selgelt parafüleetiline, kuna kõigil tänapäevastel analüüsidel pesastuvad teised loetletud perekonnad erinevates asetustes tema sisse (Yen ja Olmstead, 2000; Waterway *et al.*, 2009; Gehrke *et al.*, 2010; Escudero *et al.*, 2012a; Yano *et al.*, 2014). Hetkel on kõik nende perekondade nimed selguse säilitamise mõttes kasutusel, ent teadlased on monofüleetilise süsteemi loomise eesmärgil soovitanud ka nimede muutmist (Jegorova, 1999; Starr *et al.*, 2004; Starr ja Ford, 2009).

Ebaselge on süsteem ka alamperekondade tasemel. Hea ülevaate ajalooliselt toimunud muutustest annab Jegorova (1999), kelle kokkuvõttest (monograafia lk 22-28) ilmneb, et alamperekondade arvuks on erineval algmaterjalil ja klassifitseerimise alustel baseerudes pakutud arve kahest kahekümneni, mis selgelt iseloomustab perekonna taksonoomilist keerukust. Kõige olulisem ning tänaseni kasutatav neist on jaotus neljaks: *Primocarex* ehk *Psyllophora*, *Vignea*, *Carex* ehk *Eucarex*, *Indocarex* ehk *Vigneastr*a Kükenthal (1909)².

Tänapäeval kõige olulisema karikolooge koondava töörühma, eMonocot Team *Cyperaceae* (2015) andmetel tunnustatakse perekonnas *Carex* hetkel nelja suuremat monofüleetilist klaadi: 1) umbes 300 liigiga *Vignea* (P. Beauv. ex T. Lestib.) Peterm., mis on ainsana nii morfoloogiliste tunnuste hiilgeajal kui molekulaarsete markerite kasutuselevõtu järgselt põhijoontes säilinud (Waterway *et al.*, 2009); 2) ca 1400 liiki koondav *coreCarex* klaad, kuhu kuuluvad Kükenthal (1909) süsteemi alamperekonnad *Carex* ja *Vigneastr*a (Starr ja Ford, 2009); 3) veidi üle paarisaja liigiga *Caricoid* klaad, mis koondab nii redutseerunud õisikutega liigid perekonnast *Carex* kui

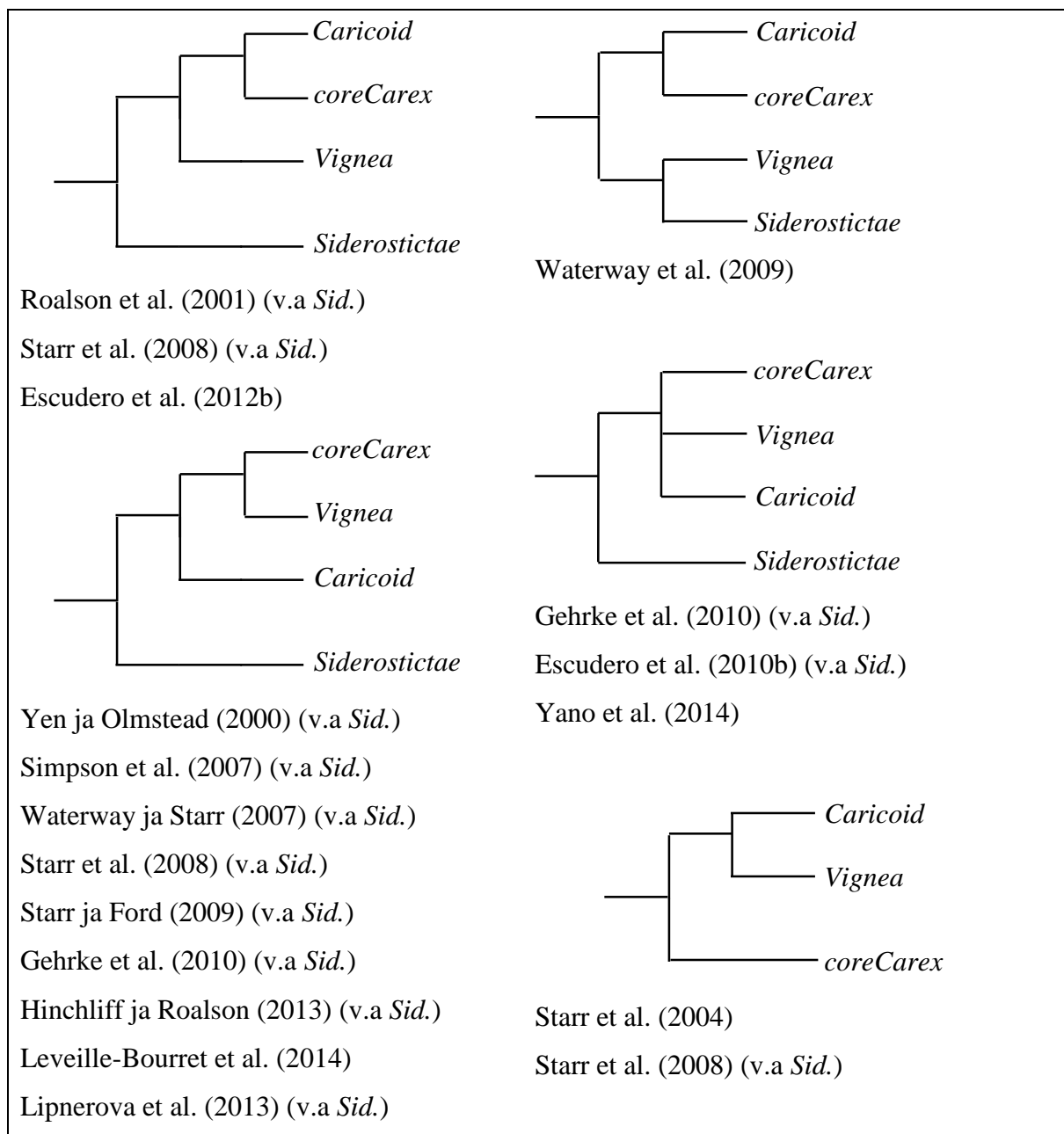
² Kükenthali monograafia, kus ta 793 liiki fülogeneetilisse raamistikku paigutas, on tänaseni üks põhjalikem maailma tärnu süstemaatilisel käsitlev töö. Paljud tänaseni kasutusel olevad jaotused perekonnas pärinevad temalt, seega on tema viitamine mõõdapääsmatu. Paraku ei ole algne töö Tartu Ülikooli raamatukogu arhiivides kättesaadav, seega on Kükenthal 1909 viited siin ja edaspidi kaudsed ehk põhinevad teiste uurijate artiklitel.

perekondade *Kobresia*, *Cymophyllus*, *Schoenoxiphium* ja *Uncinia* liigid (Escudero *et al.*, 2010b); 4) klad *Siderostictae* Franchet ex Ohwi, mille eraldas morfoloogiliselt primitiivsete tunnuste alusel esimesena Jegorova (1999). Kuigi on tegu erinevama hulga rühmadega, ning ametlikku hierarhilist taset ei ole neile määratud, käsitletakse kolme neist neljast käesolevas töös lihtsustamise eesmärgil ühiselt alam perekonna tasemel. *Siderostictae* klaadi kuuluvaid liike analüüs materjali puudumise tõttu ei hõlmanud.

Erinevad autorid ei ole nende nelja alam perekonna omavahelises suguluses seni konsensusele jõudnud. Mitmed uuemad analüüsid (Gehrke *et al.*, 2010; Hinchliff ja Roalson, 2013; Leveille-Bourret *et al.*, 2014) paigutavad *Vignea* ja *coreCarex*'i ühte klaadi ning *Caricoid* klaadi neile sõsarrühmaks, samas kui Waterway *et al.* (2009) tuvastasid, et *coreCarex*'i sõsarrühmaks on *Caricoid* klad ning neile mõlemale omakorda *Vignea*'t ning *Siderostictae*'d ühendav klad. Leitud on ka variandid, kus fülogeneetiliselt lähedasemaks on peetud klaade *coreCarex* ja *Caricoid* (Roalson *et al.*, 2001; Escudero *et al.*, 2012b) või *Vignea* ja *Caricoid* (Starr *et al.*, 2004). Escudero *et al.* (2010b), Gehrke *et al.* (2010) ja Yano *et al.* (2014) analüüsides jäid alam perekonnad lahendamata ja esitati polütoomia. On ka juhtumeid, kus samas analüüsis saadi kolm vastukäivat tulemust, kuna puu topoloogia sõltus kasutatud markeritest (Starr *et al.*, 2008). *Siderostictae* klad paikneb enamikes analüüsides, kuhu selle liikmeid kaasatud on, üsna ühemõtteliselt kõigi eelkirjeldatute sõsarrühmana (Lipnerova *et al.*, 2013). Ülevaade eri autorite süsteemidest alam perekondade tasemel on toodud joonisel 1.

Süsteemaatilise keerukuse tõttu kasutatakse tarnade puhul lisaks tavapärastele taksonoomilistele üksustele ka ICBN'i (*International Code of Botanical Nomenclature*) poolt tunnustatud seksioone ehk alam perekonna ja liigi vahelisi gruppe. Seksioonide arvuks on eri autorid pakkunud 2 kuni 130+ (Jegorova, 1999), eraldi ära märkimist neist väärivad siinkohal 69 (Kükenthal, 1909), 130 (+81 alamseksiooni) (Jegorova, 1999) ja 70 (Roalson ja Friar, 2004a). Teoreetiliselt peaksid need kõik olema loomulikud monofüleetilised rühmad; praktika näitab aga, et seksioonidesse on kokku paigutatud väga erineva fülogeneesiga taksonid, kas siis sarnase välimuse, väärade jaotamiskriteeriumite, kirjeldajate erinevate liigikontseptsioonide, hübriidiseerumise, homoplaasia (ehk tunnuste paralleelse arengu või reversiooni) (Roalson ja Friar, 2004b; Blackstock ja Ashton, 2010) või muu taolise tõttu. Üheks peamiseks põhjuseks on seejuures, et tarnad on morfoloogiliselt väga plastilised (Stenström *et al.*, 2002): on juhtumeid, kus ühes

levilas selgelt eristuvad ja eri liikidena kirjeldatud taimed omandavad teistsugustes keskkonnatingimustes omavahel väga sarnased morfoloogilised tunnused ning on seetõttu mõne teise teadlase poolt kirjeldatud ühe ja sama liigina (Hedren, 2002). Tarnade hulgas on teada nii geneetiliselt kiirelt mitmekesisistunud ent morfoloogiliselt eristamatuid (nn varjatud ehk krüptilisi) liike kui ka vastupidiseid juhtumeid (Starr ja Ford, 2009).



Joonis 1. Kolme suure alaperekonna/klaadi asetus perekonnas *Carex* erinevate autorite hinnangul. Näidatud on ka *Siderostictae* paiknemine süsteemis; juhtudel, kui artikli autorid seda rühma käsitlenud ei ole, on viite taga märkus (v.a *Sid.*).

On mitmeid tegureid, mis raskendavad tarnade taksonoomia selgitamist kõigil tasanditel, liigisiseste üksusteni (alamliik, varieteet) välja. Plastilisuse kõrval on olulisemad neist tarnade tendents anda fertiilseid või hea vegetatiivse paljunemise võimega hübriide, liigisiseste taksonite sage esinemine perekonnas, jätkuvalt aktiivne liigiteke (Jegorova, 1999) ning senise morfoloogial põhineva süstemaatika üle- või alahinnatud liikide arvu või mõne rühma monofüleetilisuse eelduse süsteemne ülekandumine ühest uuringust teise (Roalson ja Friar, 2004b; Escudero *et al.*, 2010a). Seetõttu on mitmeid tarnaliike, mille asetumine süsteemi on erinevate analüüside käigus nii vastuoluline, et need on eraldatud n-ö paigutamist ootavate taksonite rühma (*unplaced taxa*, nimetatud ka *orphan species*) (Roalson ja Friar, 2004b, a; eMonocot Team Cyperaceae, 2015).

Carex'i seksioonide ajaloolisi süsteeme Eesti liikide näitel käsitles autor ka bakalaureusetöös (Pedajas, 2011) ja järeldas, et need on üksteisele väga vasturääkivad ning et on suur vajadus edasiste uuringute järgi, kusjuures neid on otstarbekas läbi viia isoensüüm- või teiste molekulaarsete meetoditega, kuna morfoloogilised tunnused on liiga homoplastilised.

2.1.2 Ökoloogia ja elukäigutunnused

Perekonnas *Carex* leidub nii endeeme kui kosmopoliite ja ka näiteks bipolaarse areaaliga liike (teadaolevast 30st bipolaarse levikumustriga liigist kuus on tarnad) (Jegorova, 1999; Waterway ja Starr, 2007; Escudero *et al.*, 2010b). Kõigil mandritel peale Antarktika levinud perekonna *Carex* esindajad on tihti parasvöötme niiskete kasvukohtade dominandid, ent leidub ka kuivades kasvukohtades ning soojemas kliimas levivaid liike (Leck ja Schütz, 2005; Naczi ja Ford, 2008; Waterway *et al.*, 2009). Sellist laialdast diapasooni võimaldavad järgnevalt lühidalt kirjeldatud omadused.

Tarnade hulgas esineb peaaegu kõigi elukäigutunnuste osas äärmiselt suur varieeruvus (Jermy *et al.*, 2007; Naczi ja Ford, 2008). Tegu on kas mätasja ehk faalanks- või pikarisoomiliste ehk gerilja tüüpi kasvuvormiga liikidega; püsikute või aastase kasvuperioodi järel hukkuvate genetitega taimedega; k- või r-strateegidega; erinevate tingimuste suhtes generalistide või spetsialistidega (Dabros *et al.*, 2008); ise- või võõrtolmlevate liikidega; mono- (ehk elu jooksul vaid korra viljuvate) või polükarpsete (elu jooksul mitu korda viljuvate) taimedega, mille levivahendiks võib olla nii eluta (hüdrohooria, anemohooria) kui elusloodus (endo- ja epizoohooria, mürmekohooria) (Jegorova, 1999; Leck ja Schütz, 2005; Jermy *et al.*, 2007). Varieeruvust suurendab veel asjaolu, et ka sama liigi esindajad on suutelised üsna suurel määral oma strateegiaid

muutma. Näiteks võib muidu pigem mätasja vormiga liigi esindaja liigniisketes või toitainete puuduse tingimustes eelistatult panustada risoomide pikkuskasvu, kuna nende abil võib ta jõuda vajalikku gaasivahetust või toitainete hankimist võimaldavasse keskkonda (Stenström *et al.*, 2002; Jermy *et al.*, 2007). Seega võib väita, et plastilisuse olemasolu on tarnade mitmekülgsed ning stressirohkeid elupaiku arvestades nende kohasust oluliselt tõstvaks omaduseks ja seega säilib looduslikus valikus.

Nagu kirjeldatud, on tarnaisendid morfoloogiliselt ülimalt muutlikud: taimede suurus, kuju, õhulõhede tihedus ja muud vegetatiivsed (ning füsioloogilised) tunnused varieeruvad niiskus-, valgus- ja teistest keskkonnatingimustest olenevalt suurel määral. Veidi stabiilsemaid, ent Heide (2004) ja Janyszek *et al.* (2008) uuringute järgi siiski plastilisi paljunemisorganitega seotud tunnuseid nagu põisiku suurus, kuju ja lisamoodustised ning pähikute ja kandlehtede omadused, on klassikaliselt kasutatud nii liikide kui ka sektsioonide eristamiseks (Naczi ja Ford, 2008), mis on tipnenud hulga väga põhjalike kuid erinevate taksonoomiliste käsitlustega erinevate autorite poolt (Kükenthal, 1909; Jegorova, 1999; Gehrke, 2011; Molina *et al.*, 2012).

Üldise varieeruvuse taustal on erandlikult stabiilne omadus peaaegu kõigi tarnaliikide poolt kasutatav paljunemisviis – klonaalne ehk vegetatiivsete organite abil paljunemine. Suguline paljunemine ning seemnelevi on häiringuteta ökosüsteemides pigem teisese tähtsusega (Kull ja Oja, 2007), mille tõttu on tarnade viljad (puhetunud põisikus peituvad ning keskkonnatingimustele äärmiselt vastupidavad pähklikesed) peale küpsemist füsioloogilises suikeseisundis (*conditional physiological dormancy*) ning vajavad arenema hakkamiseks kindlat temperatuuride ja valguse vaheldumise režiimi – looduses aastaagu, laboris loomulikke kasvutingimusi imiteerivat stratifikatsiooni (Leck ja Schütz, 2005; Kettenring ja Galatowitsch, 2007a, b).

2.1.3 Geneetika

Tarnad on üldjuhul diploidsed, harvem diploidiseerunud organismid (Roalson ja Friar, 2004a; Kull ja Oja, 2010). See tähendab, et erinevalt ülejäänud lõikheinalistest kas a) ei mängi polüploidiseerumine perekonnas *Carex* olulist rolli; või b) polüploidiseerumise järgselt on toimunud kromosoomistiku reduktsioon ja/või inaktiveerumine. Kuna seetõttu on tarnade ekspressioonimustrid diploidseid (tõendeid polüploidiseerumisest on eranditena leitud liikidest *C. siderosticta*, *C. dolichostachya*, *C. roraimensis* sektsioonist *Ovales* ja *C. jackiana* sektsioonist

Paniceae (Hipp *et al.*, 2009; Yano *et al.*, 2014)), sobib isoensüümanalüüs nende uurimiseks väga hästi.

Lisaks on tarnade näol ühena vähestest taimeriigi esindajatest tegu holotsentriliste ehk hajusate tsentromeeri funktsiooni täitvate kromosoomiregioonidega organismidega (Escudero *et al.*, 2012b). Lihtsustatult võimaldab see kromosoomide juhuslikku ja neutraalset fragmenteerumist (*fission*) ja taasühinemist (*fusion*) ehk kromosoomide arvu muutust DNA hulga ning liigi muutumiseta, mida kokkuvõtlikult nimetatakse ka agmatoploidsuseks (Roalson, 2008; Hipp *et al.*, 2009; Escudero *et al.*, 2010a; Escudero *et al.*, 2012a). Seetõttu on tarnadel nii lähedaste liikide kui liigisiseste üksuste puhul teada ülivarieeruvaid kromosoomiarve, millest annab kõige põhjalikuma ülevaate Roalson (2008), tuues perekonna *Carex* sagedasemaks haploidseks kromosoomiarvuks $n=28-35$ ja koguulatuseks $n=5-56^3$. Kromosoomide arv on nende suurusega pöördvõrdelises seoses ning evolutsioonilises skaalas universaalselt eelistatud suunda kromosoomide arvu vähenemiseks või tõusuks ei ole tarnaperekonnas siiani tuvastatud, kuigi mitmed teadlased on püüdnud tarnade seda omadust uurida just liigitekke ja mitmekesisistumise seisukohalt (Escudero *et al.*, 2015). Stabiilsetes tingimustes paistavad siiski olevat eelistatud väiksemad, rohkem kombineeruvad kromosoomid (Escudero *et al.*, 2012a; Bures ja Zedek, 2014).

Escudero *et al.* (2010a) tulemustest lähtudes on kromosoomiarvu varieerumise ulatus üldise geneetilise mitmekesisusega märksa tugevamalt seotud kui näiteks liigi areaali suurusega, mistõttu on tegu fülogeneetiliselt informatiivse tunnusega. Seetõttu on kromosoomide lugemist kasutatud lisameetodina tarnade sektsioonidesse jaotamiseks. Eelnevaga on seotud idee, et kromosoomide arvu erinevused võivad limiteerida erinevate populatsioonide vahelist geenisiiret ja hübriidiseerumist ning tekitada üksteisest eraldunud intersteriilseid geneetilisi liine, mis omakorda võimaldab jätkuvat uute liikide teket (Hipp *et al.*, 2009; Escudero *et al.*, 2010a; Lipnerova *et al.*, 2013).

³ Peale Roalsoni ülevaateartikli ilmunist on artiklites sageli tarnade minimaalseks haploidseks kromosoomiarvuks toodud $n=6$ ($2n=12$), mis on väär. Süsteemne viga võib olla tekkinud artiklis esitatud graafiku valesti tõlgendamisest, kuna selle x-teljel märgitud esimene väärtus on 6, samas kui graafik ise algab väärtusest 5. Roalsoni artiklis toodud infotabelite põhjalikul kontrollil selgus, et minimaalseks tuvastatud haploidseks kromosoomiarvuks perekonnas *Carex* on siiski 5 ning see on leitud liigil *Carex donnell-smithii* L.H.Bailey teadlaste Ramachandran ja Jeeja poolt 1986. aastal. Kahjuks ei ole Roalsoni poolt viidatud artikkel hetkel Tartu Ülikool võrgust kättesaadav ja selle õigsus seega hinnatav. Ebaselge on ka maksimaalne kromosoomiarv, mille kohta Roalsoni esitatud graafikult võiks välja lugeda 83, samas artiklis sisalduvate algviidetega andmetabelist aga 56 (või 66, kui hõlmata ka *Uncinia* ehk käsitleda perekonda *Carex s.l.*). Artiklitesse, sealhulgas Roalsoni enda hilisematesse töödesse on levinud aga hoopis arv 62 ($2n=124$). Käesolevas töös on kasutatud Roalsoni korrektselt viidatud andmetabelitest leitavaid arve $n=5-56$.

Erineva kromosoomiarvuga isendite hübriidse järelkasvu madalamast elujõulisusest hoolimata (Escudero *et al.*, 2010a) on hübriidiseerumine tarnaperekonnas nii lähi- kui ka kaugemate liikide vahel sedavõrd levinud, et mitmed määravad ja floorad sisaldavad määramistabelites ka nn stabiilseid hübriide (Jermy *et al.*, 2007). Hübriidid ei pruugi tingimata olla vanemisendite vahepealsete tunnustega, vaid on teada, et sel teel võivad kergelt tekkida uuenduslikud ekstreemsed tunnused, mis võivad looduslikus valikus saada eelise ning seetõttu viia hübriidse liigitekkeni, näiteks introgressiooni teel (Tyler, 2003; Blackstock ja Ashton, 2010). Seda on *Carex*'i liikide puhul palju uuritud, ülevaate saamiseks sobib näiteks Gehrke *et al.* (2010) töö.

Kromosoomistiku iseärasused põhjustavad lisaprobleeme süstemaatikutele. Esiteks, seni teadaolevalt ei ole kromosoomide suuruse ja arvu muutustel evolutsioonis eelistatud suunda (Escudero *et al.*, 2012a) ning teiseks põhjustab hübriidsete isendite analüüsidesse kaasamine raskuseid tunnuste ordineerimisel. Seetõttu põhjustavad mõlemad omadused homoplaasiat, mis fülogeneesi tuvastamist raskendab. Õigem oleks sellistel juhtudel analüüsi tulemusi kajastada nn fülogeneetiliste võrkude (Gehrke *et al.*, 2010), mitte dihhotoomsete puude kujul, mida enamik üldkasutatavaid analüüsiprogramme aga ei võimalda, jättes seega fülogeneesi kulust väära mulje.

2.1.4 Tarnade kasulikkus

Oluline uurimisobjekt farmakoloogia seisukohalt on tarnade keemiline koostis. Lisaks ajaloolisele ravimtaimena kasutamisele (Simpson *et al.*, 2008) on tuvastatud, et *Carex*'i liigid (nt *C. folliculata*, *C. distachya*, *C. kobomugi*, *C. gynandra*) sisaldavad kogu taimes, kuid eriti kõrges kontsentratsioonis seemnetes, bioaktiivseid aineid, mille antioksüdatiivsed omadused on võrreldavad askorbiinhappe omaga. Leitud polüfenoolid, resveratroli oligomeerid ja flavanoidid võivad oma vähi-, seente- ning bakterivastaste ja südamehaiguse riski alandava toimega tarnadest teha toidulisandite olulise koostisosa (Li *et al.*, 2009; Gonzalez-Sarrias *et al.*, 2011). Kuna aga huvi pakkuvaid antioksüdante ei ole tuvastatud kõigist liikidest ning rohkem kui 2000 liigi põhjalik keemiline analüüs oleks väga ressursinõudlik – näiteks Li *et al.* (2009) andmetel oli analüüs läbi viidud vaid 6(!) liigi puhul – on oluline teada, millised liigid on fülogeneetiliselt lähedased, kuna on näidatud, et teatud unikaalsed biokeemilised erisused on sageli omased just monofüleetiliste rühmade liikmetele. Ülevaate sellest ja vastavast kirjandusest annavad Judd *et al.* (2002).

Ajalooliselt on tarnu kasutatud nii loomasöödana (lambad, põhjapõdrad, veised, hobused), allapanuks kui tarbeesemete punumiseks ja pakendamiseks, paberi tootmiseks ning

ehitusmaterjalina (Judd *et al.*, 2002; Stenström *et al.*, 2002; Simpson *et al.*, 2008). On teada nii selgroogsetele mürgiseid kui meetaimedena toimivaid liike, lisaks esineb umbrohu omadustega tarnu (82 liiki), mis võivad tugevalt mõjutada põllumajandust (Bryson *et al.*, 2008), ning üha suurenev arv aianduses, maastikukujunduses ning ökosüsteemide taastamises kasutatavaid liike. Simpson *et al.* (2008) andmetel on 154 liiki perekonnast *Carex* majanduslikult olulised. Tarnad on keskkonda kujundavaks, veerežiimi kontrollivaks ja elupaiku pakkuvaks taimerühmaks paljudes niiskemates ökosüsteemides ning nendest sõltub suurel määral niiskete kasvukohtade gaasivahetus (CH₄ emissiooni puhul näitasid seda efektselt Noyce *et al.* (2014)) ning primaarproduktioon. Perekonnas leidub ka endeemseid ning ohustatud taksoneid (Jermy *et al.*, 2007; Sorrie *et al.*, 2008). Seega on tarnade uurimisel on ka süstemaatikaväline praktiline väljund.

2.2 Eesmärgid

Perekonna *Carex* süstemaatikat on palju uuritud traditsiooniliselt ehk morfoloogiliste ja viimasel dekaadil ka DNA-l põhinevate meetoditega nii liigisisel, sektsioonisisel kui kogu perekonda hõlmaval tasemel (Roalson ja Friar, 2004b; Waterway *et al.*, 2009). Morfoloogial põhinevad süsteemid on kaasaegsete süstemaatikute ühisel hinnangul aegunud, ent probleeme esineb ka DNA-meetodite kasutamisel (ülevaade peamistest markeritest on leitav tööst Mondini *et al.* (2009) ja Hinchliff ja Roalson (2013)⁴), mistõttu perekonda käsitlevate uuringute hulgast hoolimata ei ole selle fülogeneesis konsensusale jõutud (Roalson ja Friar, 2004a). Esiteks on keeruline leida geeniregiooni, mille varieeruvus ja fülogeneetiline signaal oleks sellise arvu liikide eristamiseks piisav; teiseks võib suur andmekogus konsensuspuude koostamisel põhjustada muidu informatiivsete harude kollapseerumist; ning kolmandaks on seni suudetud kõige levinum marker, ITS järjestus, sekveneerida vaid 25% liikidest (Roalson ja Friar, 2004a; Waterway *et al.*, 2009). Uurimist raskendab ka see, et erinevad DNA markerid annavad üksteisele vastukäivaid tulemusi ning enamus neist on sobilikud vaid analüüsiks mõnel kindlal tasemel (Waterway ja Starr, 2007; Starr *et al.*, 2008; Starr ja Ford, 2009; Hinchliff ja Roalson, 2013).

⁴ Kasutusel on väga erinevaid nii plastiidide (nt *ndhF*, *trnE-trnD*) kui tuuma DNAI (ETS-1f), nii geenide (*rbcL*, *atp1*) kui intronite ja speisserite (ITS, *trnL*) järjestustel ning väga erineval lähenemisel (mikrosatelliidid, AFLP) põhinevaid meetodeid, mille põhjalik ülevaade ja võrdlus ei ole töö eesmärgiks.

Peale isoensüümanalüüsi esmakordset tarnadel rakendamist 1986. aastal on uuritud vaid kitsaste rühmade, seksioonide või neist madalama taseme (liikide või populatsioonide) taksonoomiat ja varieeruvust, millest andsid ülevaate Bruederle et al. (2008), mitte aga seksioonide omavahelist eristumist ega alamperekondadeks jaotumist. Kuigi neis uuringutes on saadud palju uutset informatsiooni, on mitmed autorid vihjanud, et liigi- või seksioonisiseste seoste uurimiseks jääb analüüsil eristusvõimet puudu (Micales ja Bonde, 1995; Hedren, 2002; Blackstock ja Ashton, 2010). Seega võib oletada, et isoensüümtunnuste varieeruvuse tase sobib hästi just seksioonide omavaheliseks eristamiseks ja nende fülogeneesi rekonstrueerimiseks.

Kuna iga eluslooduse rühma on otstarbekas uurida erinevate võimalike meetoditega (Simpson *et al.*, 2007), et hilisemal metaanalüüsil reaalse fülogeneesi väljaselgitamisele võimalikult lähedale jõuda, on praktiline uurida perekonda *Carex* ka isoensüümanalüüsi abil. Lisapõhjusteks isoensüümanalüüsi läbiviimiseks on selle meetodi lihtsus, kiirus, odavus, vajaduse puudumine keerulise laboriaparatuuri järele ning suur hulk juba olemasolevaid andmeid erinevate taimerühmade kohta, mis võimaldavad teha võrdlusi ja saadud tulemusi paremini mõista.

Käesoleva töö peamised eesmärgid on:

- Iseloomustada perekonna *Carex* liikide, seksioonide ning suuremate klaadide geneetilist varieerumist isoensüümmarkerite alusel.
- Selgitada, kas leitud erinevused on piisavad rühmade eristamiseks loetletud tasemetel.
- Tuvastada taksonite monofüleetilisusele viitavaid unikaalseid allele.
- Püstitada leitud varieeruvuse põhjal fülogeneesihüpotees.
- Võrrelda seda hüpoteesi morfoloogiliste ning DNA-markeritel baseeruvate uuringute tulemustega.
- Teha järeldused, kas isoensüümanalüüs on seksioonide tasemel tarnade uurimiseks sama otstarbekas ja täpne, kui kallimad ja keerukamad DNA-meetodid.

3. Materjal ja metoodika

3.1 Taimne materjal

Töös kasutatud taimne materjal pärineb peamiselt Euroopa 12 erineva riigi 22 botaanikaaiast kataloogide alusel vahetusmaterjalina hangitud seemnetest. Lisaks on liigi- ja populatsioonisisese varieeruvuse hinnangu võimaldamiseks analüüsi kaasatud 21 ümberistutatud isendit liigi *C. viridula* Eesti populatsioonist. Tellitud seemned säilitati kuivades tingimustes toatemperatuuril 12-24 kuud, seejärel stratifitseeriti poole aasta jooksul üldise idanevuse suurendamise eesmärgil erinevates tötlustes⁵ (Leck ja Schütz, 2005; Kettenring ja Galatowitsch, 2007b, a), idandati (idanevus varieerus seejuures eri liikide ja tötluste puhul 5%-100%, keskmine 56%) ning istutati 2010. aasta kevadel esialgu pottidesse, hiljem võimalikult homogeensete tingimustega välipeenrale. Peale generatiivse ja morfoloogilise küpsuse saavutamist koguti isenditest herbaarmaterjal, mis on tõendmaterjalina säilitatud Tartu Ülikooli Loodusmuuseumi botaanika- ja mükoloogiamuuseumi herbaariumis (TU). Herbaarmaterjali põhjaliku stereobinokulaari (Olympus SZX7) abil uurimise teel on määratud ka lõplikus analüüsis kasutatud liigid.

Liikide määramisel lähtuti eelkõige eMonocot Team Cyperaceae (2015) kui uusima ning kõige laialdasemalt kättesaadava andmebaasi liigikirjeldustest. Liigid, mille kirjeldusi toodud andmebaasis ei leidunud, määrati teiste allikate põhjal (Jegorova, 1999; Jermy *et al.*, 2007; eFloras, 2008), vastuolude korral eelistati uuemat kirjeldust. Kuna hangitud seemnetest kasvatatud taimede põhjaliku mikromorfoloogial põhineva kontrolli käigus selgus, et algsetest, saatja poolt antud liigimäärangutest üle 20% ei vastanud isendite tegelikule liigile, korrigeeriti seda analüüside käigus. Tabelis 1 on toodud töös kasutatud lõplikult determineeritud liikide korrektne ladinakeelne nimi, sektsiooniline ja alamperekonna tasemega võrdustatud kuuluvus eMonocot Team Cyperaceae (2015) andmete põhjal ning liigi levila.

⁵ On näidatud, et eri tarnaliikide seemned eelistavad neile iseloomulikust füsioloogilisest dormantsusest väljumiseks erinevaid keskkonnatingimuste komplekte. Kindlustamaks käesolevas uuringus võimalikult paljude liikide esindajate idanemist, jagati kõik seemned kolme märgstratifikatsiooni tötluse vahel: öö 5°C pime ja päev 5°C pime; öö 5°C pime ja päev 22°C valge; öö 22°C valge ja päev 22°C valge.

Tabel 1. Töös kasutatud liikide täisnimed, isendite arv, sektsiooniline ning nn alamperekonna taseme (*Caricoid*, *coreCarex*, *Vigneae*) jaotuvus ning liigi esinemine neljas peamises tarnade levikualas: Euroopa sh Venemaa lääneosa ning Island (EUR), Põhja-Ameerika (PAM), Aasia, sh Jaapan (AAS) ja Põhja-Aafrika (PAF). Tabel järgib põhijoontes eMonocot Team Cyperaceae (2015) töörühma süsteemi, tärniga (*) tähistatud informatsioon pärineb teistest töös viidatud allikatest; „int“ tähistab piirkonda introdutseeritud või võõrliiki; esinemine Eestis (EST) on toodud Eesti taimede määraja (Leht *et al.*, 2010) andmetel.

liik (32)	arv	sektsioon (22)	EUR	PAM	AAS	PAF	EST*
<i>Caricoid</i>	2						
<i>Carex pulicaris</i> L.	2	<i>Distachya-clade</i>	jah	ei	ei	ei	jah
<i>CoreCarex</i>	141						
<i>Carex fuliginosa</i> Schkuhr	1	<i>Aulocystis</i> Dumort.	jah*	jah*	jah*	ei*	ei
<i>Carex sempervirens</i> Vill.	4	<i>Aulocystis</i> Dumort.	jah	ei	ei	ei	ei
<i>Carex flava</i> L.	15	<i>Ceratocystis</i> Dumort.	jah	jah	jah	jah*	jah
<i>Carex hostiana</i> DC.	2	<i>Ceratocystis</i> Dumort.	jah	ei*	jah*		jah
<i>Carex viridula</i> Michx.	26	<i>Ceratocystis</i> Dumort.	jah	jah	jah	jah*	jah
<i>Carex capillaris</i> L.	2	<i>Chlorostachyae</i> Tuck. ex Meinsh.	jah	jah	jah	jah	jah
<i>Carex panicea</i> L.	6	<i>Paniceae</i> G.Don	jah	int	jah	jah	jah
<i>Carex acuta</i> L.	3	<i>Phacocystis</i> Dumort.	jah	ei	jah	ei*	jah
<i>Carex nigra</i> (L.) Reichard	7	<i>Phacocystis</i> Dumort.	jah	jah	jah	jah	jah
<i>Carex pallescens</i> L.	10	<i>Porocystis</i> Dumort.	jah	jah	jah*		jah
<i>Carex atrata</i> L.	4	<i>Racemosae</i> G.Don	jah	ei	jah		ei
<i>Carex pendula</i> Huds.	9	<i>Rhynchocystis</i> Dumort.	jah	int	jah	jah	ei
<i>Carex distans</i> L.	8	<i>Spirostachyae</i> (Drejer) L.H.Bailey	jah	ei	jah*	jah	jah
<i>Carex punctata</i> Gaudin	5	<i>Spirostachyae</i> (Drejer) L.H.Bailey	jah	ei	ei*	jah	ei
<i>Carex sylvatica</i> Huds.	14	<i>Sylvaticae</i> Rouy	jah	int	jah	int	jah
<i>Carex flacca</i> Schreb.	11	<i>Thuringiaca</i> G.Don	jah	jah	jah	jah	jah
<i>Carex pseudocyperus</i> L.	14	<i>Vesicariae</i> (Heuff.) J.Carey	jah	jah	jah		jah
<i>Vigneae</i>	113						
<i>Carex arenaria</i> L.	6	<i>Ammoglochin</i> Dumort.	jah	int	jah*		jah
<i>Carex praecox</i> Schreb.	5	<i>Ammoglochin</i> Dumort.	jah	ei	jah*		jah
<i>Carex pseudobrizoides</i> Clavaud	1	<i>Ammoglochin</i> Dumort.	jah	ei	jah*		ei

<i>Carex chordorrhiza</i> L.f.	3	<i>Chordorrhizae</i> (Heuff.) Meinsh.	jah	jah*	ei	ei	jah
<i>Carex vernacula</i> L.H. Bailey	4	<i>Foetidae</i> (Tuck. ex L.H.Bailey) Kük.	ei*	jah*	ei*	ei*	ei
<i>Carex diandra</i> Schrank	5	<i>Heleoglochin</i> Dumort.	jah	jah	jah		jah
<i>Carex paniculata</i> L.	7	<i>Heleoglochin</i> Dumort.	jah	ei	jah*	jah	jah
<i>Carex leporina</i> L.	11	<i>Ovales</i> Kunth	jah	int	jah	jah	jah
<i>Carex aggregata</i> Mack.	12	<i>Phaestoglochin</i> Dumort.	ei*	jah*			ei
<i>Carex divulsa</i> Stokes	5	<i>Phaestoglochin</i> Dumort.	jah	int	jah	jah	ei
<i>Carex spicata</i> Huds.	10	<i>Phaestoglochin</i> Dumort.	jah	int	jah	jah	jah
<i>Carex davalliana</i> Sm.	5	<i>Physoglochin</i> Dumort.	jah	ei	jah		jah
<i>Carex remota</i> L.	11	<i>Remotae</i> (Ashers.) C.B.Clarke	jah	ei	jah	jah	jah
<i>Carex cuprina</i> (Sándor ex Heuff.) Nendtv. ex A.Kern.	28	<i>Vulpinae</i> (Heuff.) H.Christ	jah	ei	jah		jah

3.2 Isoensüümanalüüs

3.2.1 Teoreetiline taust

Isoensüümid (ka isosüümid) on identset keemilist protsessi katalüüsiva valgu erinevad molekulaarsed vormid, mis võivad tekkida kolmel teel: a) tegu võib olla sama geneetilise lookuse erinevate alleelide produktidega (allosüümid ehk allelosüümid ehk alloensüümid); b) isoensüümid võivad olla erinevate, ühesuguse katalüütilise toimega ensüüme kodeerivate, lookuste produktid (heterosüümid); c) toimunud võib olla erinev post-translatsiooniline modifikatsioon. Kui selle tulemusel omandab valk erineva laengu (või ka kuju või molekulaarkaalu), on ta teistest variantidest eristatav geelelektroforeesi elektriväljas (Wendel ja Weeden, 1989a, b; Micales ja Bonde, 1995). Seda kasutatakse ära isoensüümanalüüsil, kus foreesis erinevale kaugusele liikunud isoensüüm kodeeritakse kõigi teiste variantide suhtes, tõlgendatakse genotüübina ning saadakse sel teel andmed, mis on edasi kasutatavad nii süstemaatilistes, geneetilistes, biogeograafilistes kui ka ökoloogilistes uuringutes (Oja, 1999).

Isoensüümanalüüsi tulemuste kasutamisel fülogeneesi rekonstrueerimiseks on oluliseks eelduseks see, et mitmete lookuste tunnuste kombineerimisel saadud alleelse varieeruvuse mustrid järgivad üldiselt taimerühma, mitte konkreetse geeni evolutsiooni (ehk tulemuseks saadakse liigi-, mitte geenipuu). Kuna see meetod eristab vaid erineva laengu, suuruse või kuju omandanud ensüümivariante (Judd *et al.*, 2002), mitte iga aluspaari muutust valku kodeerivas geenis (põhjuseks geneetilise koodi redundantsus), hinnatakse rühma tegelikku geneetilist varieeruvust veidi alla⁶ (Micales ja Bonde, 1995; Conte *et al.*, 2008). Hierarhiliselt kõrgema taseme süstemaatilistes uuringutes ei ole see aga märkimisväärseks probleemiks, kuna tuvastatav varieeruvus on igal juhul piisav. Isoensüümanalüüs on seega konservatiivne meetod ning võib öelda, et rühmad, mis sel meetodil eristuvad, on tõepoolest erinevad ja tegu ei ole näilise eristumisega.

Isoensüümid on kodominantsed markerid, seega informatsioon, mis ühe lookuse analüüsimisel saadakse, võimaldab hinnata uuritava rühma heterosügootsuse ja selle läbi inbriidingu või geneetilise vaesumise astet. Viimast on ära kasutatud näiteks endeemsete liikide populatsioonide geneetiliseks hindamiseks ja looduskaitsete suuniste andmiseks (Tyler, 2003; Kull ja Oja, 2007, 2010; Talve *et al.*, 2012).

3.2.2 Laboritöö

Ensüümide eraldamine, ilmutamine ja esialgne kodeerimine viidi läbi kolmel järjestikusel suvel (aastatel 2010-2012) välipeenralt korjatud värskel taimmaterjalil (308 isendit 42 liigist)⁷. Analüüsiks vajalikud ensüümekstraktid valmistati iga päev vahetult enne laboritöö algust korjatud isendi kõige noorema lehe ligikaudu 2 cm² suuruse tüki purustamisel homogeniseerimispuhvris D või puhvris M. Viskoossuse tõstmiseks lisati homogenaatidele 20-50 mg sahharoos – Sephadex G200 segu (4:1). Homogenaate hoiti ensüümide aktiivsuse languse aeglustamiseks jahutatud alusel. Analüüsiks kasutati 11 erinevat ensüümsüsteemi: AAT, ADH, EST, IDH, MDH, PGD, PGI, PGM,

⁶ Sellegipoolest on isoensüümanalüüsi geneetilise varieeruvuse hindamiseks viimase ~25 aasta jooksul väga palju kasutatud.

⁷ Paralleelselt isoensüümanalüüsiga eraldati kõigist isenditest ka DNA. Selle eesmärgiks oli samade isendite võrdlev analüüsimine mikrosatelliitmarkerite abil, ent kuna käesoleva magistritöö maht seda ei võimaldanud, ootavad need proovid analüüsimist edaspidi.

PRX⁸, SKD, SOD, mille täisnimed ja EC koodid (*enzyme commission number*) valguandmeid koondava andmebaasi ExPASy (Gasteiger *et al.*, 2003) järgi on toodud tabelis 3.

Polüakrüülamiid elektroforeesi (PAGE) geel valmistati kolmest lahusest proportsiooniga 2 osa akrüülamiidilahust (A), 1 osa geelipuhvrit (B) ja 1 osa riboflaviinilahust (R). R lahus oli kõigi süsteemide puhul identne, A ja B lahuste täpne koostis sõltus uuritavast ensüümist, kus alleeliproduktide lahutumise muutmiseks geelis varieeriti A puhul akrüülamiidi (AA) ja/või bisakrüülamiidi (Bis) ning B puhul tris(hüdroksümetüül)aminometaani (Tris) kontsentratsiooni vastavalt tööühma varasemale kogemusele (Oja, 1999; Kull ja Oja, 2007, 2010; Talve *et al.*, 2012) ning ensüümivariantide eraldumise ja ilmnemise efektiivsusele katseforeesidel. Anoodpuhver (AN) oli kõigi ensüümide puhul identne ning katoodpuhvriks kasutati kas AK1 või AK3 lahuseid.

Kasutatud lahuste koostised olid järgnevad:

- D puhver: 1,5 g Tris (0,05M) + 0,75 g EDTA-H₂ (0,01 M) + 250 ml H₂O⁹ + 3 mg tsüsteiini või DDT'd 2,5 ml puhvri kohta.
- M puhver: 1,25 g Tris (0,1 M) + 0,5 ml kontsentreeritud HCl + 0,5 ml β-merkaptotoetanool (70 mM) + 100 ml H₂O + 0,5 g Na metabisulfit (26 mM) + 0,2 g askorbiinhape (110 mM) + 4 g polüvinüülpirrolidoon ehk PVP (4%) + 3 mg tsüsteiini või DDT'd 2,5 ml puhvri kohta.
- A7: 15% AA (6 g) 0,4%Bis (160 mg) 34 ml H₂O
- A2: 20% AA (10 g) 0,4%Bis (200 mg) 40 ml H₂O
- A3: 20% AA (10 g) 0,6%Bis (300 mg) 40 ml H₂O
- A9: 25% AA (10 g) 0,5%Bis (200 g) 30 ml H₂O
- B4: 0,4 M Tris HCl (6,3 g) 0,6 M Tris (7,3 g) 100 ml H₂O 0,2 ml TEMED
- B6: 0,4 M Tris HCl (6,3 g) 0,2 M Tris (2,4 g) 100 ml H₂O 0,2 ml TEMED
- R: ühe geeli kohta 5 ml H₂O + 0,15 ml kontsentreeritud riboflaviini lahust (20 mg riboflaviini + 10 ml H₂O) + 0,05 ml persulfaadi lahust (80 mg (NH₄)₂S₂O₈ + 2 ml H₂O).
- AN: 6 g Tris + 0,6 ml CH₃COOH + 1000 ml H₂O (pH 9-7)
- AK1: 20 ml kontsentraat (1 g KOH + 6 g glütsiin (0,08 M) + 100 ml H₂O) + 100 ml H₂O + broomfenoolsinine 4 tilka

⁸ Peroksüdaasi ensüümogrammide ei olnud üheselt interpreteeritavad, seega seda tööd edaspidi ei kajastata.

⁹ Siin ja edaspidi on tegu destilleeritud veega.

- AK3: 150 ml H₂O + 0,3 g Tris või 0,1 g KOH + 0,75 g H₃BO₃ (0,08 M) + broomfenoolsinine 4 tilka

Geeli koostise ja puhvrite süsteemi valik sõltus esialgsete katsetuste tulemuste põhjal ensüümist nagu näidatud tabelis 2.

Tabel 2. Foreesil kasutatud geeli- ja puhversüsteemide komponendid.

Ensüüm	AK	A	B
AAT, ADH, IDH, MDH, PGD, SKD	AK1	A2	B6
EST, SOD	AK1	A3võiA4	B4
PGI, PGM	AK3võiAK1	A7	B6

Forees viidi läbi jääkotil jahutatud elektroforeesiaparaadiga EC120 Mini Vertical Gel System (25-40 mA, 20-30 V/cm², 1,5-2,5 h), täpne homogeneadi kogus ning foreesi aeg sõltus konkreetsest ensüümist ning otsustati empiiriliste katsetuste käigus.

Geelid ilmutati klassikaliste histokeemiliste meetoditega (Wendel ja Weeden, 1989a), mida modifitseeriti vastavalt Jaaska ja Jaaska (1990) ning töörühma poolt välja töötatud võtetega (Oja, 1999; Talve *et al.*, 2012). Koheselt peale värvimisreaktsiooni lõpetamist fotografeeriti ensüümogrammide (negatiivse värvinguga SOD'i puhul kasutati tulemuste nähtavaks muutmiseks UV valgust, teised ensüümid pildistati tavameetodil), pildifailid salvestati, printiti ja varustati ensüümsüsteemi, isendikoodide ja muu vajaliku taustinfoga. Hiljem pildid interpreteeriti ning kodeeriti mitmes sõltumatus korduses.

Käesolevas analüüsis kasutati ensüümide kodeerimisel tähistusviisi, kus elektriväljas kiiremini liikuvate lookuste produktid märgiti suurtähtedega tähestikulises järjestuses (A lookus on kiirem kui sama ensüümi B lookus jne). Konkreetse lookuse alleelid tähistati numbrilises järjekorras, kus kiiremini liikuvale alleelile vastas väiksem number (alleelivariant 1 on kiirem kui sama ensüümi sama lookuse alleel 2 jne). Heterosügootsete dimeersete ensüümide puhul märgiti üles mõlemad alleelid. Nullalleeli ehk katalüütilise aktiivsusega elektroforeetilise variandi esinemine märgiti, kui see ensüümipiltidelt ilma igasuguse kahtluseta selge oli (Wendel ja Weeden, 1989a, b), vastasel juhul sisestati see andmematriksisse puuduva infona.

3.3 Andmeanalüüs

3.3.1 GenAlEx, R (Tukey)

Peale kaheldava liigimäärangu või liialt suure koguse puuduva infoga indiviidide eemaldamist jäi lõplikku analüüsi 256 indiviidi 32 liigist. Andmete analüüsiks kasutati Microsoft Exceli-põhist geneetilise analüüsi moodulit GenAlEx 6.501 (Peakall ja Smouse, 2006; Peakall ja Smouse, 2012) (edaspidi GenAlEx), kus programmi vaikimisi kategoriseerivaks ühikuks olevate populatsioonide asemel grupeeriti isendeid kolmel tasandil: liikide, seksioonide või alamperekondade kaupa. Selleks viidi esialgne andmekodeering kodominantsele kujule, puuduv info tähistati programmi nõuetele vastavalt „0“-ga ning arvutati isendite vahelised geneetilised distantid GD (*Distance – Genetic – Codom-Genotypic*), mille põhjal tehti andmestiku ülevaatlikustamise eesmärgil peakoordinaatanalüüsi graafikud kõigil kolmel eelpool mainitud tasemel (*PcoA – Analysis – Distance-Standardized*). Lisaks leiti GenAlEx'i funktsiooni *Frequency* abil kõigi lookuste kõigi alleelide sagedused (*Frequency by Pop*, töölehe tähis AFP), privaatsete alleelide nimekiri (*Private allele list*) ning AMOVA funktsiooniga (*Analysis of molecular variance; AMOVA – codom-allelic – analysis for total only – Permutations 999 – suppress within individual analysis*) varieeruvuse jagunemine liikide-, seksioonide- ning alamperekondade sisesteks ja -vahelisteks komponentideks. Liigi tasemel viidi AMOVA läbi 256 isendi asemel 254 isendi põhjal, kuna analüüsist tuli eemaldada ainult ühe isendiga esindatud liigid *C. fuliginosa* ja *C. pseudobrizoides*.

Seksioonide ja liikide eristumise statistiliseks hindamiseks kasutati programmi R v3.1.2 (R Core Development Team, 2004), mille abil viidi läbi ANOVA ja seejärel Tukey test (*Tukey's honest significant difference test*, `STATS::aov`, `TukeyHSD`). Kategoriseerivaks tunnuseks olid kas liigid või seksioonid ning sisendiks olid tunnuste vähendamise eesmärgil PcoA analüüsis arvutatud peakoordinaadid ehk omavektorid (*eigenvector*).

3.3.2 PAUP*, Figtree

Fülogeneesihüpoteesi püstitamiseks ning uuritavate indiviidide ja rühmade geneetilise sarnasuse ja eristumise visualiseerimiseks kasutati erinevaid analüüse programmis PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2003) (*Phylogenetic Analysis Using Parsimony*, edaspidi PAUP). Selleks transformeeriti indiviidide ensüümandmestik binaarsele kujule, puuduv info tähistati nõuetele

vastavalt „?“-ga. Liigi ja seksiooni tasemel binaarse andmematriksi loomisel märgiti tunnuse väärtuseks 1, kui see esines vähemalt ühel sellesse gruppi kuuluval isendil; puuduvat infot sel meetodil arvestada võimalik ei olnud. Välisrühmaks (ehk ülejäänud uuritavatest evolutsiooniliselt kõige kaugemaks taksoniks, mille järgi analüüsiprogramm määrab tunnuste polarisatsiooni (Judd *et al.*, 2002)) määrati kirjandusele tuginedes (vt joonis 1) isendi tasemel liigi *C. pulicaris* kaks isendit, liigi tasemel *C. pulicaris* ning seksiooni tasemel *Distachya* klaad, millesse eelmainitud liik kuulub. Kõik tunnused olid isoensüümandmetele kohaselt analüüsides ordineerimata ning võrdse kaaluga.

Kuna on teada, et erinevad klasterdusmeetodid annavad samade algandmete põhjal mõningal määral erinevaid tulemusi (Leitner *et al.*, 1996; Judd *et al.*, 2002), kasutati feneetilisteks analüüsideks nii kesksideme meetodit (UPGMA *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) kui lähimsideme meetodit (NJ, *Neighbour Joining*). Fülogeneetilise hinnangu saamiseks viidi läbi heuristiline otsing parameetritega (*nrep*=1000, *addseq*=random, *swap*=TBR, *steepest*=yes, *multrees*=no), mille kasuks otsustati suuremahuliste tarnade süstemaatikat käsitlevate artiklite (viidatud joonisel 1) metoodikate analüüsil. Arvutati näitajad püsivusindeks CI (*consistency index*), mis näitab reversioonide ja paralleelsuse olemasolu puus ja varieerub 0-1, kus 1 tähendab, et iga tunnus on muutunud vaid korra, ja retentsiooniindeks RI (*retention index*), mis võrdleb, tegelike muutuste arvu maksimaalse potentsiaalsete muutuste arvuga vastavas andmestikus ja varieerub samuti nullist üheni. Leitud võrdselt minimaalsete puude järgi arvutati 50% konsensuspuu, harude toetuse hindamiseks rakendati nn kingapaelaanalüüsi (*Bootstrap*) samadel allikatel põhinedes valitud parameetritega (*nrep*=100*100, *addseq*=random, *swap*=TBR, *steepest*=yes, *multrees*=no). Kasutatud PAUP'i käsufaili näidis koos analüüsi parameetritega on toodud lisas 1. Kõik analüüsid põhinesid Fitchi parsimoonial ehk säästuprintsiibil.

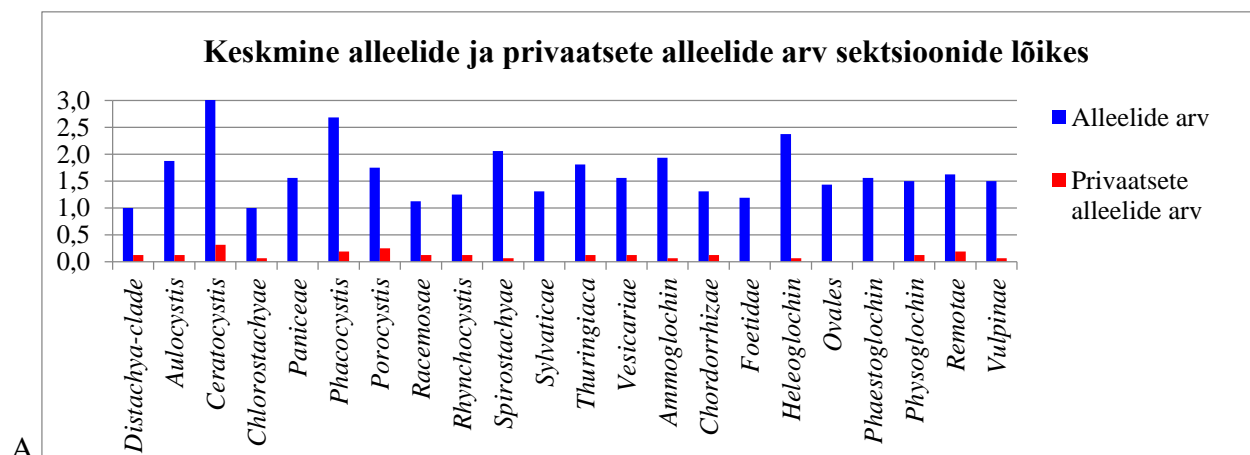
Eelnevatest analüüsidesaadud puufailid muudeti loetavaks fülogeneesipuude redigeerimise programmide Treeview (Page, 1996) ja Fig Tree v1.4.2 (Rambaut *et al.*, 2015) abil.

4. Tulemused

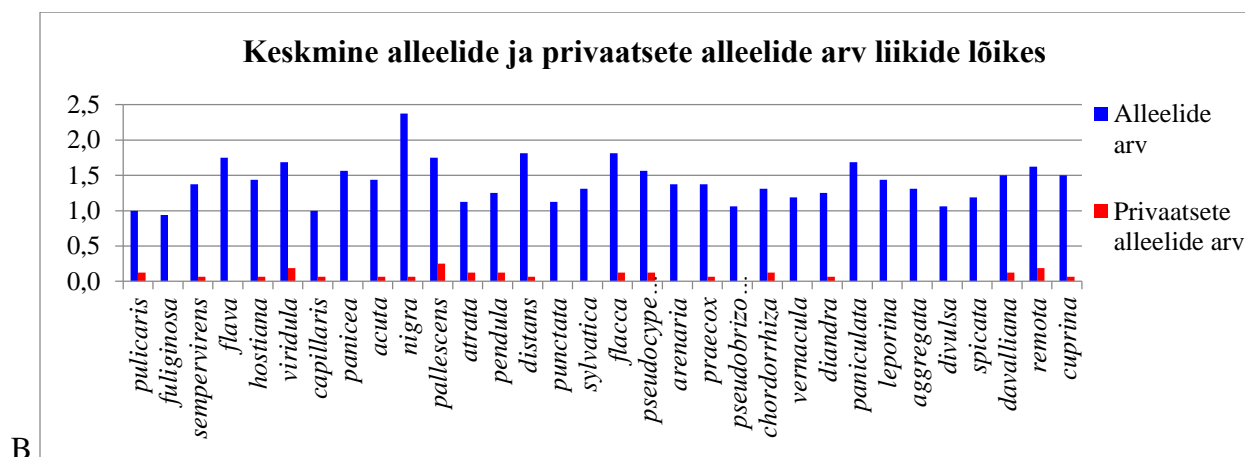
4.1 Allo- ja heterosüümne varieeruvus

Isoensüümanalüüsil tuvastati testitud 11 ensüümi peale kokku 31 lookust, millest edasiseks analüüsiks olid piisavalt selgelt interpreteeritavad 16 mono- või dimeerset lookust, mis on esitatud tabelis 3. Kõik lookused olid polümorfsed, lookuse kohta tuvastatud alleelide arv varieerus viiest (SOD B) üheteistkümne (AAT A) alleelini. Keskmiselt leiti ühest lookusest 8-9 alleelivarianti ning kokku tuvastati 139 erinevat alleeli. Kõik alleelid, nende esinemissagedused ning unikaalsed alleelid nii liigi kui sektsiooni tasemel on toodud ära lisas 2.

Sektsiooni tasemel tuvastati privaatseid allelele kokku 36 ja neid esines kõigis uuritud lookustes ning 17 sektsioonis 22st. Privaatseid allelele ei leitud sektsioonides *Paniceae*, *Sylvaticae*, *Foetida*, *Ovales*, *Phaestoglochin*. Liigi tasemel oli unikaalseid allelele 33, mis jagunesid kõigi lookuste ning 19 liigi vahel 32st. Privaatseid allelele ei leitud liikides *C. fuliginosa*, *C. flava*, *C. panicea*, *C. punctata*, *C. sylvatica*, *C. arenaria*, *C. pseudobrizoides*, *C. vernacula*, *C. paniculata*, *C. leporina*, *C. aggregata*, *C. divulsa*, *C. spicata*. Liikide ja sektsioonide keskmised alleelide ning privaatsete alleelide arvud kõigi lookuste peale kokku on näidatud joonisel 2.



Joonis 2A. Keskmine alleelide ja privaatsete alleelide arv (A) sektsioonides ja (B) liikides.



B

Joonis 2B. Keskmine alleelide ja privaatsete alleelide arv (A) seksioonides ja (B) liikides.

Ensümogrammide põhjal tuvastati lisaks homosügootsetele isenditele ka mõne lookuse suhtes heterosügootseid isendeid. Homosügootse isendi ja monomeerse ensüümilookuse puhul ilmneb pildil üks, dimeerse lookuse puhul kaks vööti; heterosügootse isendi ja monomeerse ensüümilookuse puhul üks, dimeerse lookuse puhul kolm vööti ehk triplet (Wendel ja Weeden, 1989a; Micales ja Bonde, 1995). Heterosügootsete isendite osakaalud igas lookuses on toodud tabelis 3.

Tabel 3. Isoensüümanalüüsi ensüümide lühendid, nimed ja EC koodid; tuvastatud ja kirjanduse andmetel olemas olev lookuste arv; kodeeritud lookuse tähis, ensüümi kvaternaarstruktuur (meersus) ja alleelide arv; heterosügootsete isendite osakaal lookuses.

lühend	ensüümi täisnimi ja EC kood	lookuseid tuvastatud	lookuseid kirjanduse andmetel	kodeeritud lookused	ensüümi meersus	tuvastatud alleelide arv (139)	heterosügootsuse osakaal Ho
AAT	aspartaadi aminotransferaas (EC 2.6.1.1)	4	4	AAT B	dimeer	10	0,018
				AAT A	dimeer	11	0,012
ADH	alkoholi dehüdrogenaas (EC 1.1.1.1)	2	1-3	ADH B	dimeer	7	0,067
EST	esteraas (EC 3.1.1.?)	6	2-10	EST E	monomeer	10	0,152
IDH	isotsitraadi dehüdrogenaas (EC 1.1.1.42)	2	2	IDH B	dimeer	7	0,012
MDH	malaadi dehüdrogenaas (EC 1.1.1.37)	3	3	MDH B	dimeer	8	0,004
				MDH A	dimeer	8	0,012
PGD	6-fosfoglükonaadi dehüdrogenaas (EC 1.1.1.44)	1	2	PGD A	dimeer	8	0,016

PGI	fosfoglükoiisomeraas (EC 5.3.1.9)	2	2	PGI B	dimeer	8	0,059
				PGI A	monomeer	9	0,109
PGM	fosfoglükomutaas (EC 5.4.2.2)	2	2	PGM B	monomeer	9	0,262
				PGM A	monomeer	9	0,408
SKD	shikimaadi dehüdrogenaas (EC 1.1.1.25)	2	1-2	SKD B	monomeer	10	0,062
SOD	superoksiidi dismutaas (EC 1.15.1.1)	3	3	SOD C	dimeer	10	0,045
				SOD B	dimeer	5	0,047
				SOD A	dimeer	10	0,072

4.2 Liikide ja sektsioonide statistiline eristumine isoensüümtunnuste alusel

4.2.1 Tukey HSD testi tulemused

Sektsioonide ja liikide vahelise erinevuse olemasolu tuvastamiseks läbi viidud Tukey test, mis võimaldab erinevalt ANOVast korraga võrrelda paljusid rühmi, näitas, et peaaegu kõik võrreldud taksonite paarid eristuvad üksteisest esimeste nelja peakoordinaatvektori põhjal statistiliselt oluliselt ($p < 0,05$). Sektsioonide puhul on tulemused koondatud tabelitesse 4 ja 5, statistiliselt olulise erinevuse olemasolu võrreldavate rühmade vahel on tähistatud paksu kirjaga. Esimese nelja peakoordinaatvektori põhjal paarikaupa analüüsides ei olnud kõigist võimalikest 131 sektsioonide kombinatsioonist omavahel statistiliselt oluliselt eristatavad vaid 20 paari: *Ammoglochin* ja *Distachya-clade*; *Distachya-clade* ja *Foetidae*; *Distachya-clade* ja *Ovales*; *Distachya-clade* ja *Remotae*; *Ammoglochin* ja *Foetidae*; *Chordorrhizae* ja *Foetidae*; *Chordorrhizae* ja *Physoglochin*; *Foetidae* ja *Physoglochin*; *Ovales* ja *Physoglochin*; *Aulocystis* ja *Phacocystis*; *Aulocystis* ja *Porocystis*; *Chlorostachyae* ja *Phacocystis*; *Chlorostachyae* ja *Porocystis*; *Chlorostachyae* ja *Spirostachyae*; *Chlorostachyae* ja *Thuringiaca*; *Paniceae* ja *Racemosae*; *Paniceae* ja *Spirostachyae*; *Phacocystis* ja *Spirostachyae*; *Porocystis* ja *Thuringiaca*; *Racemosae* ja *Spirostachyae*.

Tabel 4. Sektsioonide eristumine Tukey HSD testil esimese kahe peakoordinaatvektori põhjal. Paksus kirjas on toodud statistiliselt olulised erinevused võrdluspaaari vahel.

PC1\PC2	Vulpina	Vesicar	Thuring	Sylvati	Spirost	Rhyncho	Remotae	Racemos	Porocys	Physogl	Phaesto	Phacocy	Panicea	Ovales	Heleogl	Foetida	Distach	Chordor	Chloros	Ceratoc	Aulocys	Ammoglo
Vulpina		0,97	0,07	0,00	0,65	0,05	0,82	0,02	0,43	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00	0,15	0,50	0,92	1,00	1,00	0,00	0,24	0,00
Vesicar	0,00		0,99	0,01	1,00	0,96	1,00	0,54	1,00	1,00	0,73	0,18	0,11	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	0,99	0,16
Thuring	0,00	0,00		0,77	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,64	0,01	1,00	0,94	0,96	1,00	1,00	1,00	1,00	0,86	0,00	1,00	1,00
Sylvati	0,00	0,00	0,38		0,07	0,96	0,09	1,00	0,39	0,00	0,00	1,00	1,00	0,00	0,49	1,00	1,00	0,85	0,09	0,00	1,00	1,00
Spirost	0,00	0,00	0,26	1,00		1,00	1,00	0,84	1,00	0,98	0,28	0,56	0,36	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	0,00	1,00	0,55
Rhyncho	0,00	1,00	0,00	0,00	0,01		1,00	1,00	1,00	0,52	0,01	1,00	0,99	0,89	1,00	1,00	1,00	1,00	0,78	0,00	1,00	1,00
Remotae	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,83	1,00	0,99	0,47	0,57	0,36	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,57
Racemos	0,00	0,80	0,16	1,00	1,00	0,96	0,00		0,97	0,15	0,01	1,00	1,00	0,41	0,99	1,00	1,00	0,99	0,35	0,00	1,00	1,00
Porocys	0,00	0,00	0,99	1,00	1,00	0,00	0,00	0,94		0,92	0,16	0,92	0,72	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,97	0,00	1,00	0,93
Physogl	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00		1,00	0,05	0,02	1,00	0,79	0,80	0,96	1,00	1,00	0,03	0,64	0,04
Phaesto	0,36	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,98	0,03	0,27	0,81	0,99	1,00	0,00	0,09	0,00
Phacocy	0,00	0,39	0,00	0,90	0,97	0,83	0,00	1,00	0,37	0,00	0,00		1,00	0,11	0,96	1,00	1,00	0,99	0,27	0,00	1,00	1,00
Panicea	0,00	0,97	0,00	0,77	0,89	1,00	0,00	1,00	0,28	0,00	0,00	1,00		0,07	0,81	1,00	1,00	0,91	0,15	0,00	1,00	1,00
Ovales	0,41	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00		0,99	0,99	1,00	1,00	1,00	0,00	0,95	0,10
Heleogl	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		1,00	1,00	1,00	0,92	0,00	1,00	0,97
Foetida	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,43	0,00	0,00	0,00	0,01	1,00		1,00	1,00	0,88	0,00	1,00	1,00
Distach	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,78	0,00	0,00	0,00	0,13	1,00	1,00		1,00	0,96	0,00	1,00	1,00
Chordor	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,54	0,00	0,00	0,00	0,02	1,00	1,00	1,00		1,00	0,00	1,00	0,99
Chloros	0,00	0,01	1,00	0,99	0,98	0,02	0,00	0,81	1,00	0,00	0,00	0,51	0,36	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00		0,92	0,80	0,28
Ceratoc	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,33	0,00	0,00	0,00	0,01	0,56	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Aulocys	0,00	1,00	0,00	0,51	0,67	1,00	0,00	1,00	0,14	0,00	0,00	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,22	0,97		1,00
Ammoglo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,77	0,99	0,93	0,04	0,00	0,00	

Tabel 5. Sektsioonide eristumine Tukey HSD testil teise ja kolmanda peakoordinaatvektori põhjal. Paksus kirjas on toodud statistiliselt olulised erinevused võrdluspaaari vahel.

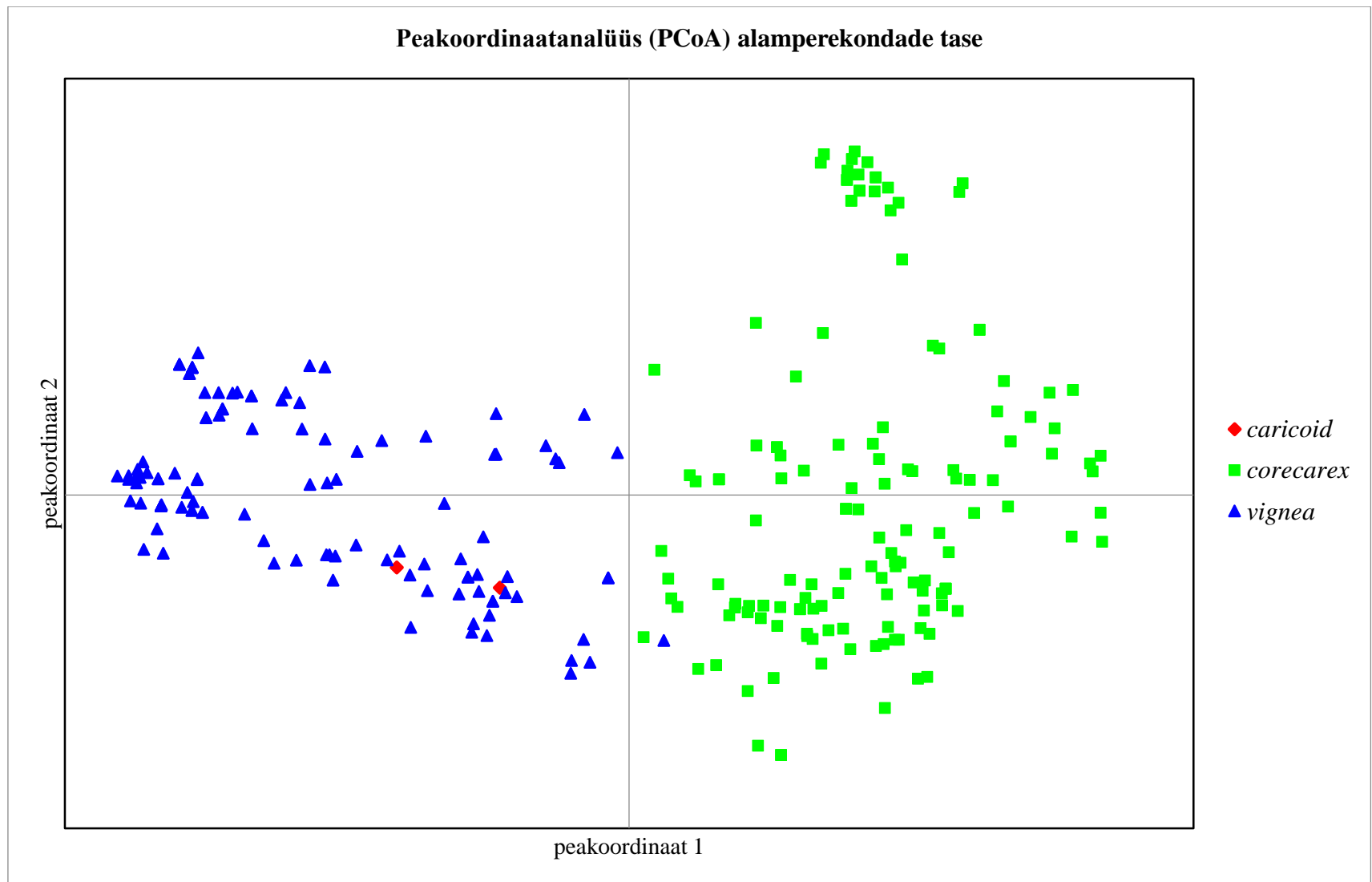
PC3\PC4	Vulpina	Vesicar	Thuring	Sylvati	Spirost	Rhyncho	Remotae	Racemos	Porocys	Physogl	Phaesto	Phacocy	Panicea	Ovales	Heleogl	Foetida	Distach	Chordor	Chloros	Ceratoc	Aulocys	Ammoglo
Vulpina		0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	1,00	1,00	1,00	0,13	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,31	1,00	0,45	0,96	0,60	1,00
Vesicar	0,00		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Thuring	0,00	0,00		0,00	1,00	0,00	0,00	1,00	1,00	0,97	0,03	0,77	1,00	1,00	0,13	1,00	0,10	1,00	0,93	0,46	0,19	1,00
Sylvati	1,00	0,00	0,00		0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,25	0,00	0,00	0,11	1,00	0,00	0,00	0,00
Spirost	0,00	1,00	0,00	0,01		0,00	0,00	1,00	1,00	1,00	0,10	0,96	1,00	1,00	0,02	1,00	0,18	1,00	0,77	0,81	0,38	1,00
Rhyncho	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08	0,00	0,00	0,04	0,98	0,00	0,00	0,00
Remotae	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,01	0,00	0,34	0,14	0,08	0,00	0,00	0,00	0,36	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00
Racemos	1,00	0,80	0,00	1,00	0,90	0,00	0,00		1,00	1,00	0,80	1,00	1,00	1,00	0,51	1,00	0,36	1,00	0,94	1,00	0,77	1,00
Porocys	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,97	0,00	0,00		1,00	0,49	1,00	1,00	1,00	0,01	1,00	0,32	1,00	0,67	0,99	0,68	1,00
Physogl	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,77	0,00	0,00	1,00		1,00	1,00	0,94	1,00	0,00	1,00	0,93	0,94	0,27	1,00	1,00	1,00
Phaesto	0,00	0,83	0,00	0,00	0,65	0,15	0,00	0,03	0,00	0,00		1,00	0,08	0,47	0,00	1,00	0,98	0,30	0,02	0,98	1,00	0,53
Phacocy	0,00	0,42	0,31	0,00	0,28	0,97	0,00	0,01	0,04	0,02	1,00		0,74	1,00	0,00	1,00	0,89	0,83	0,14	1,00	1,00	1,00
Panicea	0,80	0,83	0,00	1,00	0,93	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,01	0,00		1,00	0,74	0,99	0,08	1,00	0,99	0,57	0,19	1,00
Ovales	0,00	0,00	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,63	1,00	0,00	0,00	0,00		0,01	1,00	0,33	1,00	0,63	0,99	0,68	1,00
Heleogl	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,02	0,00	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00
Foetida	0,00	0,00	0,46	0,00	0,00	0,10	0,01	0,00	0,92	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00		0,91	0,98	0,42	1,00	1,00	1,00
Distach	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,07	1,00	0,26		0,11	0,01	0,74	1,00	0,37
Chordor	0,00	0,09	1,00	0,00	0,06	1,00	0,00	0,00	1,00	1,00	0,71	0,99	0,00	0,52	0,00	0,71	0,00		1,00	0,79	0,31	1,00
Chloros	0,00	0,12	1,00	0,00	0,09	1,00	0,00	0,00	1,00	1,00	0,68	0,98	0,00	0,97	0,00	0,98	0,01	1,00		0,10	0,02	0,56
Ceratoc	0,00	0,00	0,98	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,40	0,26	0,00	0,94	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	1,00	1,00		0,99	1,00
Aulocys	0,00	0,03	1,00	0,00	0,02	1,00	0,00	0,00	1,00	0,92	0,57	1,00	0,00	0,06	0,00	0,25	0,00	1,00	1,00	1,00		0,73
Ammoglo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07	0,00	0,00	0,15	0,00	0,00	0,00	0,56	0,00	0,99	0,86	0,00	0,15	0,00	0,00	

Liikide puhul esines sarnane tendents: enamus neist eristusid paariviisilistel võrdlustel statistiliselt oluliselt vähemalt ühe peakoordinaatvektori suhtes neljast esimesest. Tabeli kujul tulemusi siinkohal käesoleva töö mahupiirangut arvestades toodud ei ole.

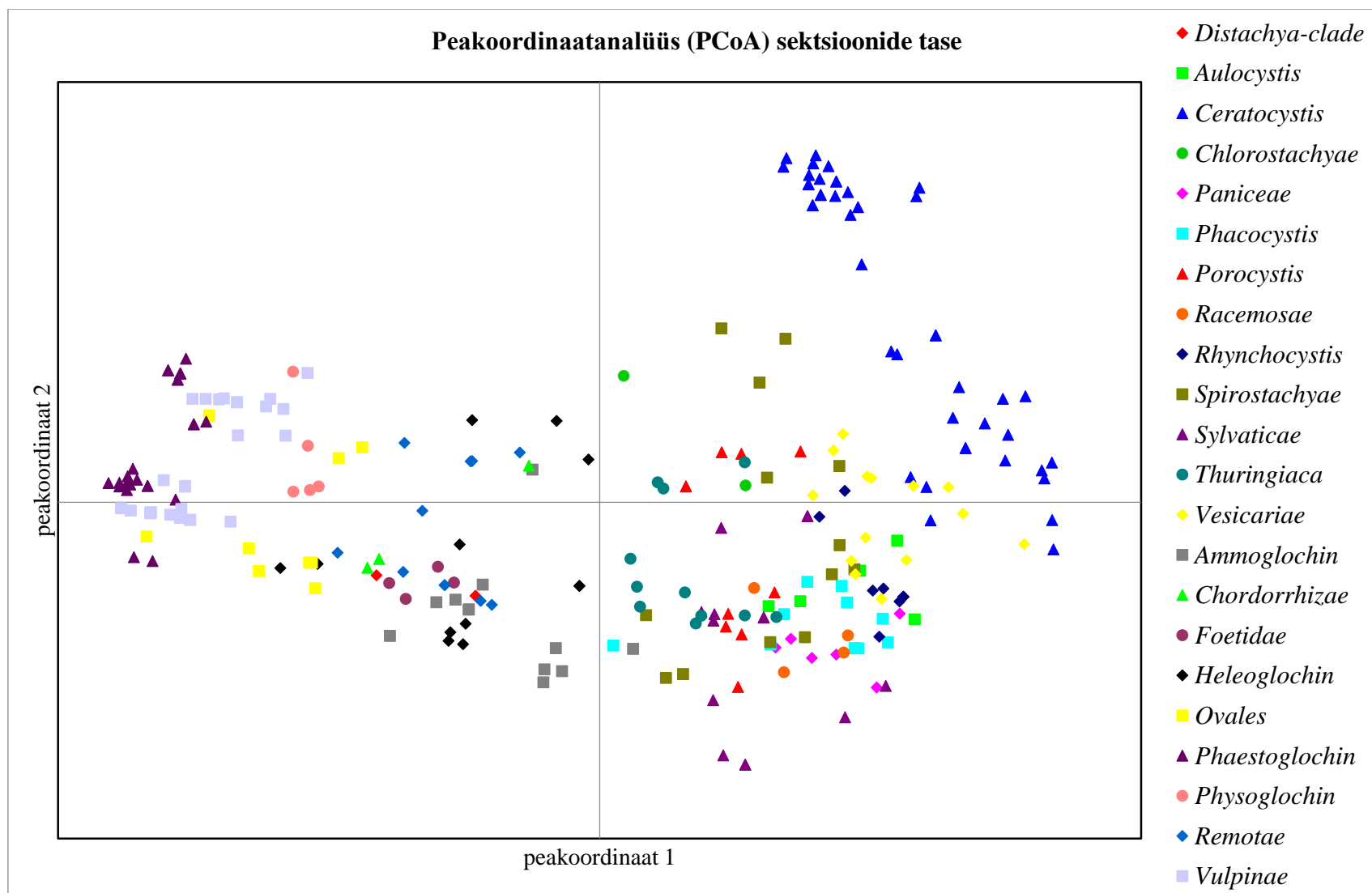
4.2.2 Peakoordinaatanalüüsi (PcoA) tulemused

Alamperekondade, seksioonide ja liikide eristumise ning grupeerumise illustreerimiseks geneetilise distantssi põhjal arvutatud esimese kahe PcoA telje graafikud on toodud joonistel 3-5¹⁰. Esimese-kolmanda ning teise-kolmanda telje graafikud märkimisväärselt ei erinenud ning siin neid seetõttu esitatud ei ole. Kuigi esimesed kolm telge seletavad varieeruvusest ära vaid 36,85%, eristuvad *Vignea* ja *coreCarex* klaadid selgelt. *Caricoid* klaadi isendid paiknevad *Vignea*'st eristamatult. Seksioonide (ja liikide) isendid moodustavad kas selgelt piiritletud kompaktsed või hajusamaid gruppe, täielikku hiaatust üldiselt ei esine, vaid grupid on servaaladel kattuvad, seda eriti *coreCarex*'i liikide puhul. Silmatorkavaks erandiks on siin seksioon *Ceratocystis* (*C. viridula* ja *C. flava*), eriti Eestist korjatud *C. viridula* (tähistatud helesinise ringiga joonisel 5). Esines ka selgelt mitmeks grupiks klasterduvaid liike nagu *C. cuprina* (joonisel 5 tähistatud kahe rohelise ovaaljoonega).

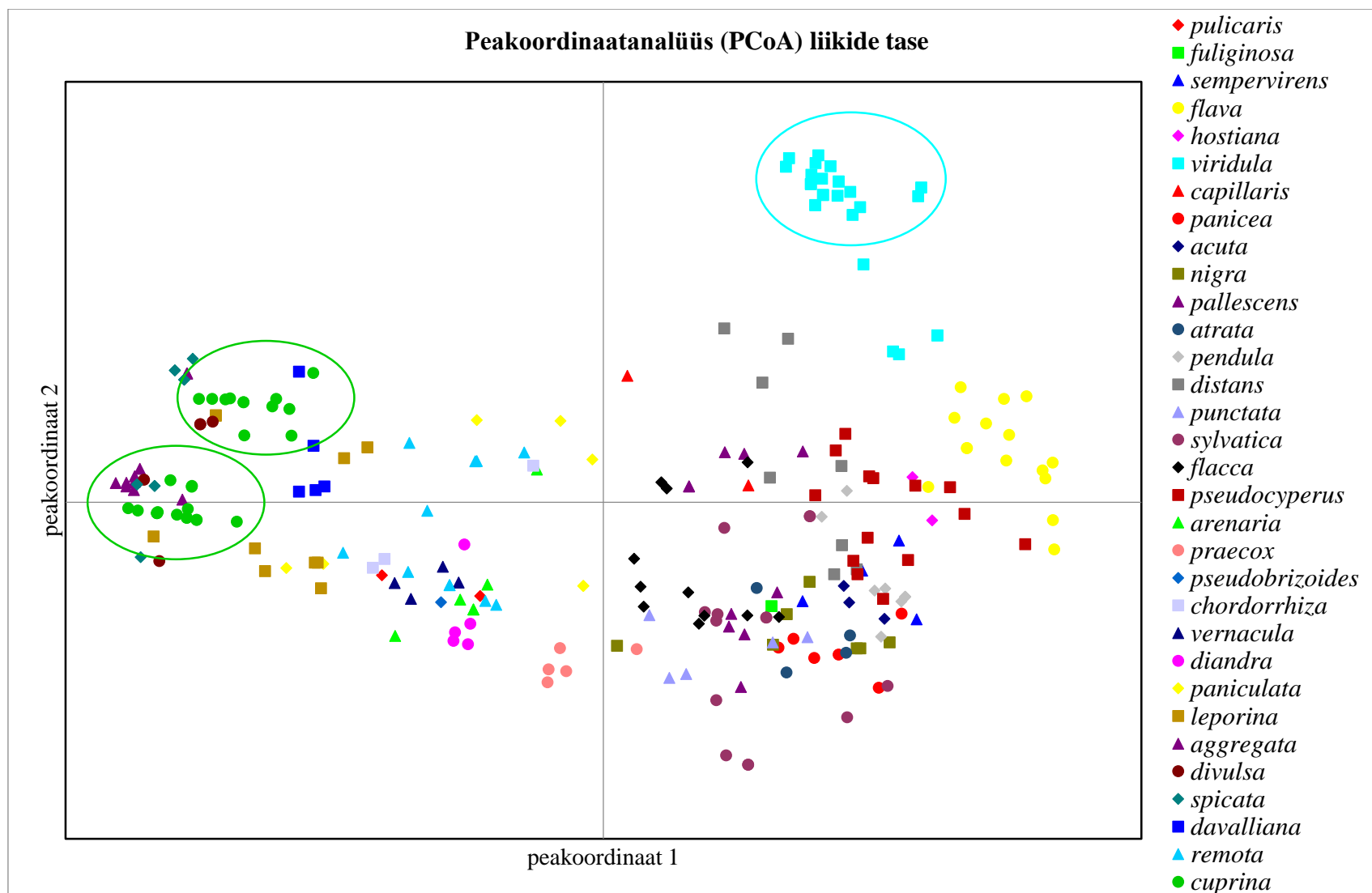
¹⁰ Siin ja edaspidi tähistab kõigi PcoA graafikute puhul üks punkt ühte analüüsitud isendit.



Joonis 3. Peakoordinaatanalüüsi graafik esimese kahe koordinaatvektori põhjal. Erinevate värvidega on tähistatud analüüsitud isendite n-ö alamperekonna taseme grupeerumine.



Joonis 4. Peakoordinaatanalüüsi graafik esimese kahe koordinaatvektori põhjal. Erinevate värvidega on tähistatud analüüsitud isendite sektsiooniline kuuluvus.



Joonis 5. Peakoordinaatanalüüsi graafik esimese kahe koordinaatvektori põhjal. Erinevate värvidega on tähistatud analüüsitud isendite liigiline kuuluvus. Kõik joonisel toodud liigid on perekonnast *Carex*. Ovaalidega on ümbritsetud tekstis eraldi käsitletud grupid.

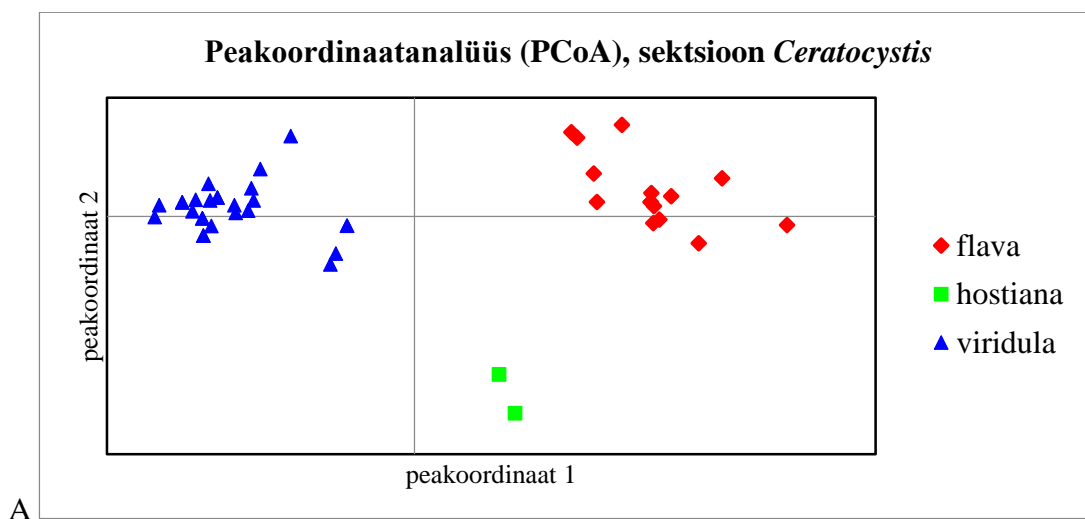
Sektsiooni- ja liigisisese varieeruvuse erinevate mustrite illustreerimiseks on kasutatud samuti PcoA graafikuid ning näideteks on alljärgnevalt tutvustatud põhjustel valitud neist neli. Graafikud on esitatud joonisel 6.

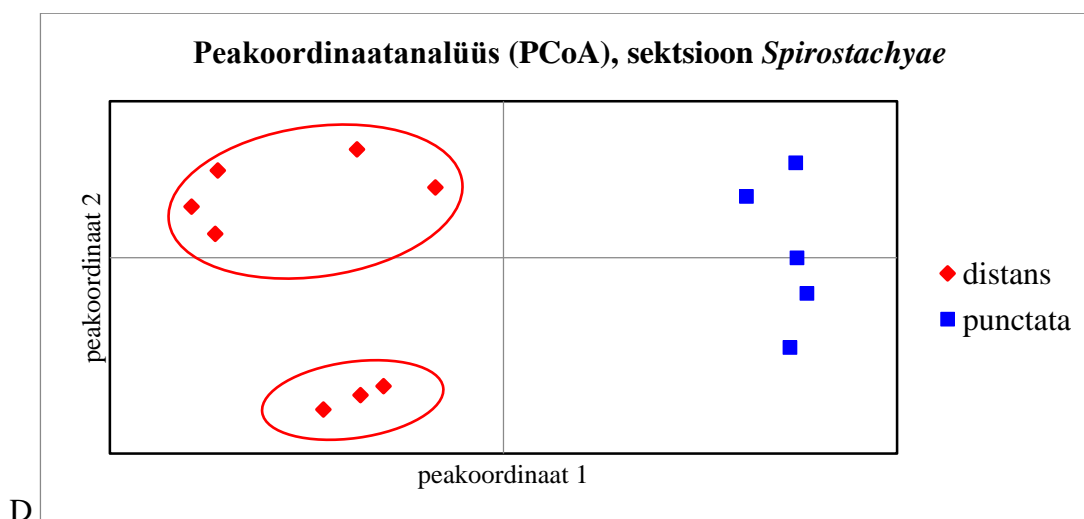
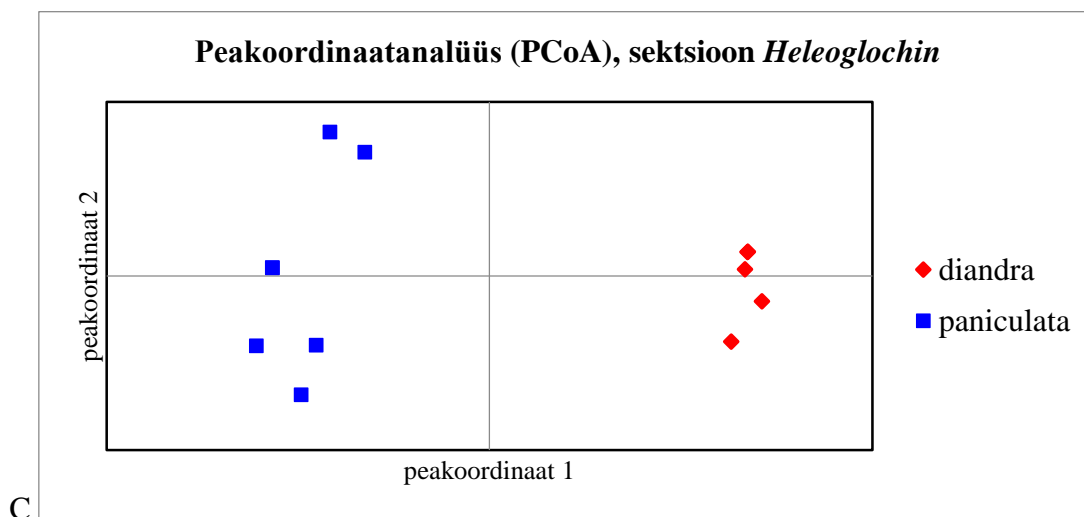
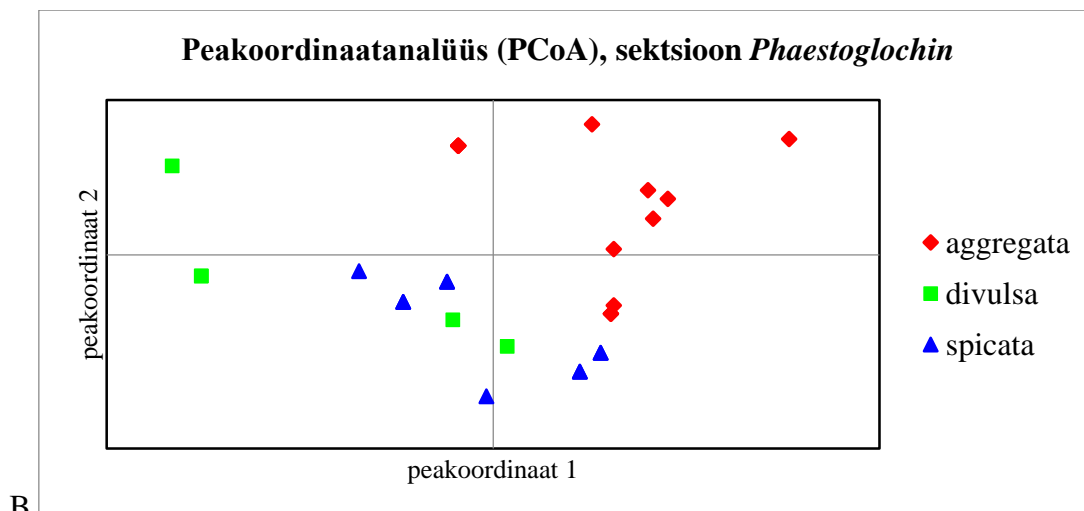
Esiteks pakkus huvi töörühmas juba varasemalt uuritud sektsioon *Ceratocystis*, millest kuulusid käesolevasse analüüsi liigid *C. flava*, *C. hostiana* ja *C. viridula*. Kolm liiki klasterduvad üksteisest selgelt eraldi, rohkemate isenditega liikide puhul on selgelt näha ka liigisisene varieeruvus. Kolm esimest peakoordinaattelge seletasid kumulatiivselt varieeruvusest ära 84,29%.

Sektsioon *Phaestoglochin* valiti, kuna selle liikmete eristumine oli käesoleva uuringu teistes analüüsides ebaselge ning vajab täpsustamist. Nagu jooniselt 6 näha, moodustab *C. aggregata* ühtse, kuigi hajusa klatri, ent liikide *C. spicata* ja *C. divulsa* isendid mitte, paiknedes graafikul läbisegi. Kolm esimest peakoordinaattelge seletasid kumulatiivselt varieeruvusest ära 78,92%.

Äärmiselt selge tulemuse andis nii kirjanduse kui käesoleva analüüsi andmetel parafüleetiline sektsioon *Heleoglochin* liikidega *C. diandra* ja *C. paniculata*, mis grupeerusid üksteisest selgelt eraldi. Kolm esimest peakoordinaattelge seletasid kumulatiivselt varieeruvusest ära 95,48%.

Neljandaks näiteks on sektsioon *Spirostachyae*, mille liikidest *C. distans* jaguneb oma isoensüümtunnustelt kahte selge hiaatusega gruppi (joonisel 6 ümbritsetud punaste ovaalidega). *C. punctata* isendite vahel hiaatust ei ole. Kolm esimest peakoordinaattelge seletasid kumulatiivselt varieeruvusest ära 86,39%.

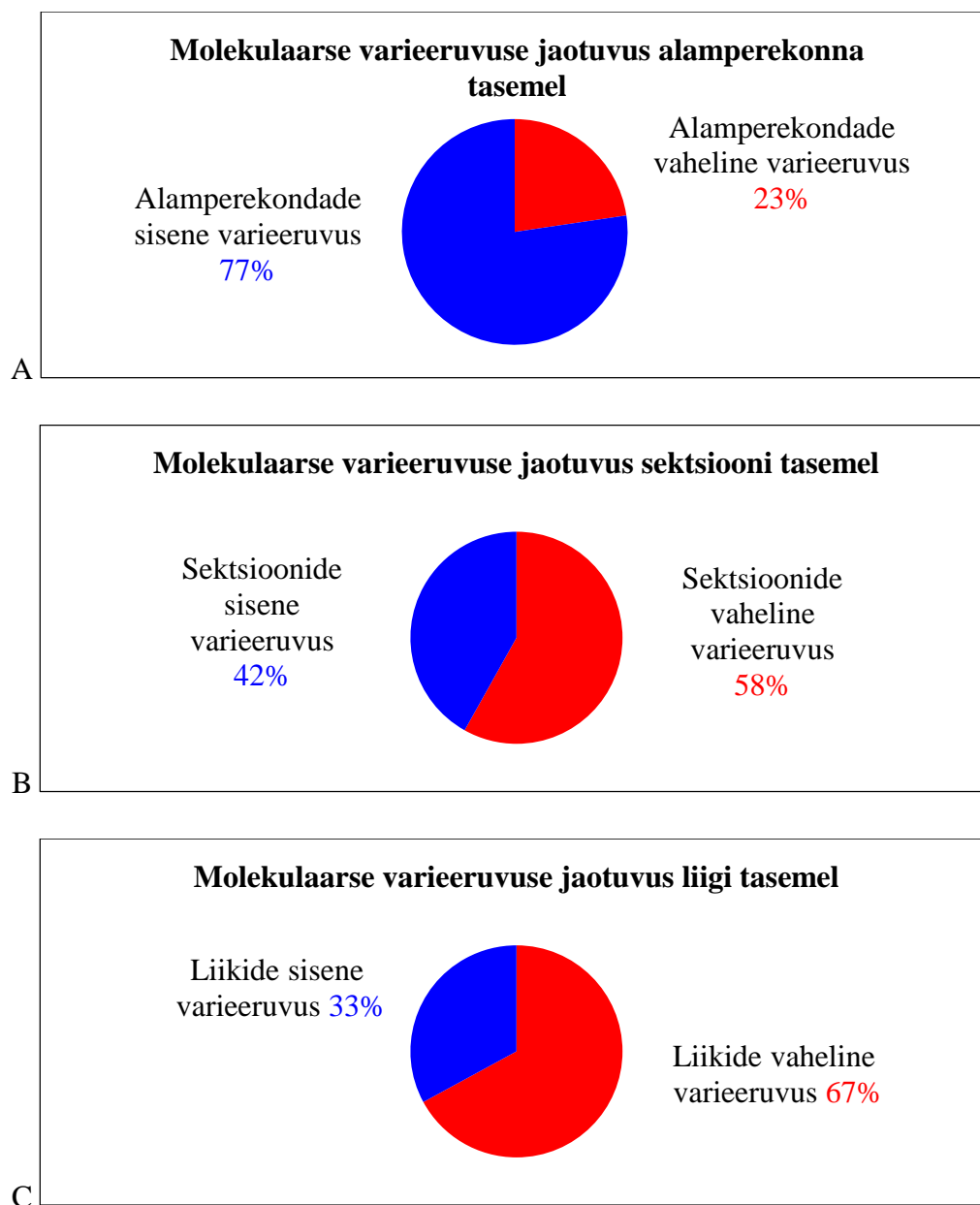




Joonis 6. Seksioonide *Ceratocystis* (A), *Phaestoglochin* (B), *Heleoglochin* (C) ja *Spirostachyae* (D) liikide eristumine PcoA graafikutel.

4.2.3 Molekulaarse varieeruvuse jaotumine (AMOVA)

AMOVA analüüsi tulemused on esitatud joonisel 7. Alamperekondade tasemel tulenes 77% varieeruvusest alamperekondade sisesest ja vaid 23% nende vahelistest geneetilistest muustritest. Sektsiooni tasemel moodustas sektsioonidesisene komponent 42% varieeruvusest, ülejäänud tulenes sektsioonide vahelisest mitmekesisusest. Liigi tasemel olid vastavad näitajad 33% ja 67%.



Joonis 7. Molekulaarse varieeruvuse jaotus (A) alamperekondade siseseks ja väliseks, (B) sektsioonide siseseks ja väliseks ning (C) liikide siseseks ja väliseks komponendiks.

4.3 Liikide ja seksioonide feneetiline ja kladistiline eristumine

Feneetilist ja kladistilist eristumist uuriti vastavalt UPGMA, NJ ja heuristilise otsingu meetoditega. Analüüsid viidi läbi nii eelkirjeldatud isendi, liigi kui seksiooni taseme andmemaatriksiga, kuid kuna viimaste kahe tulemusel saadud puude topoloogia erines tunduvalt isendite põhjal arvutatud puudest, milles oli puuduv info korrektselt arvesse võetud, siis neid edasises analüüsis ei kasutatud ja siin ei käsitleta. Paljude liikide puhul jäi isendite omavaheline paiknemine lahendamata ning esitati puudes polütoomiana.

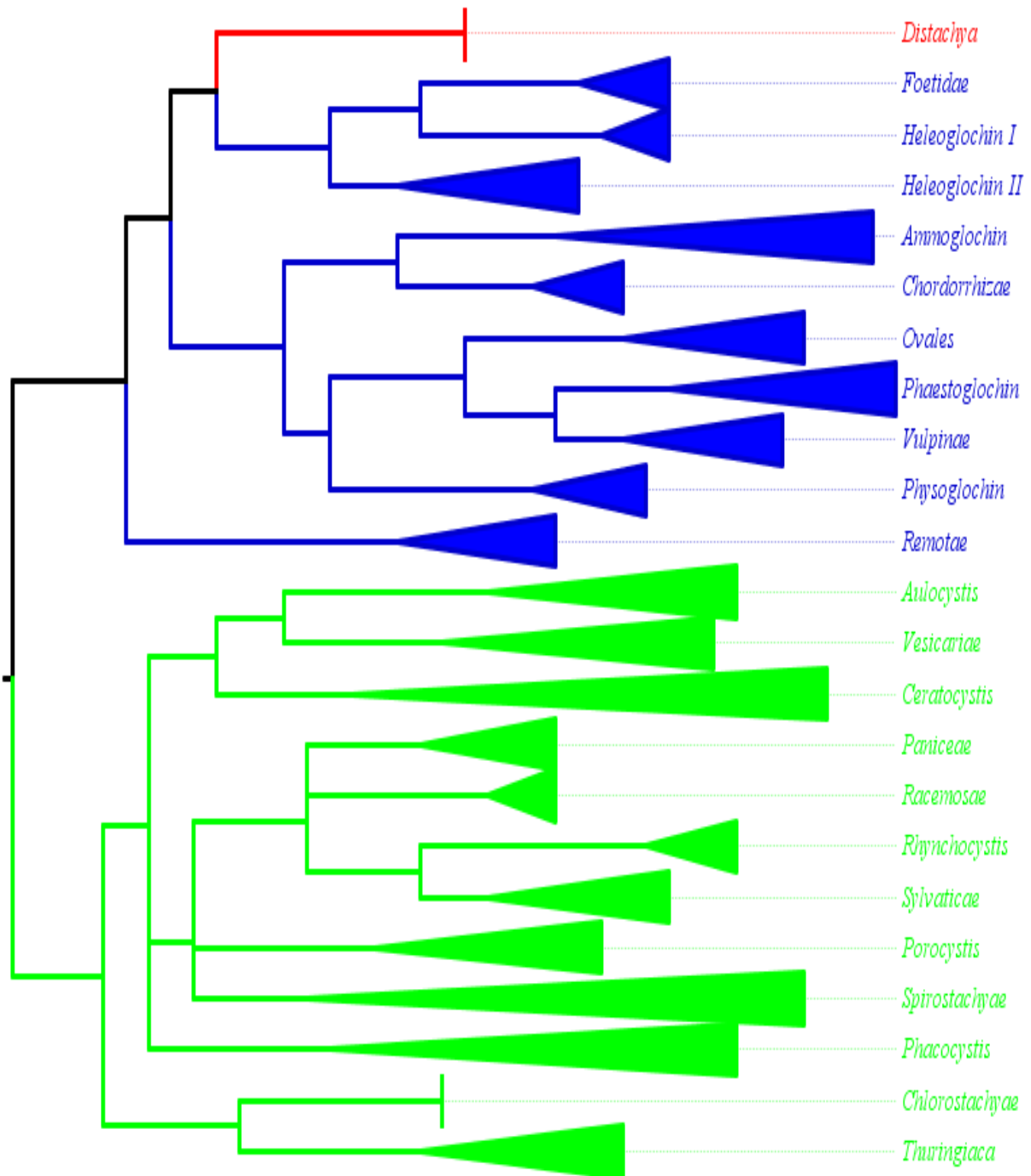
Samaks liigiks määratud isendid eristusid kõigil analüüsidel ja peaaegu kõigil juhtudel omaette klastrisse (erandiks seksiooni *Phaestoglochin* liigid, mille hulgas leidis kõigi analüüside puhul polütoomiat, ning üks *C. nigra* isend, mis oli NJ puhul liigi ülejäänud isendeid ja *C. acuta*'t ühendava haru sõsarrühmaks ning UPGMA puhul sõsaraks *C. acuta*'le). Kehtiva süsteemi järgi samasse seksiooni kuuluvad liigid klasterdusid peale üksikute erandite, mida on kirjeldatud edaspidi, samuti kokku. Seetõttu on joonistel 8, 9 ja 10 esitatud ja analüüsis viidatud puid, kus algsed isendid on vastavateks seksioonideks koondatud. Kui isendeid ja liike sel teel ühemõtteliselt tähistada ei saanud, on seksiooni erinevad osad tähistatud rooma numbritega I, II (ja III).

UPGMA analüüs andis tulemuseks 793 muutussammu pikkuse puu näitajatega $CI=0,1753$; $RI=0,8281$, mis on tervikuna ära toodud lisas 3, koondatud variant joonisel 8. *CoreCarex* määratlusega taksonid grupeeruvad selgelt eraldi, moodustades ühe, enamikke seksioone hõlmava, kuid mitmel tasemel polütoomse jagunemisega klatri ja *Chlorostachyae-Thuringiaca* sõsarklatri. *Vignea*'s on eristatavad kolm treppja asetusega klattrit. Üks seksioon, *Heleoglochin*, jaguneb vastavalt liigile (I – *C. diandra*; II – *C. paniculata*) kaheks grupiks. *Caricoid* klaadi kuuluv *Distachya* paigutub muidu *Vignea* seksioone ühendavale harule.

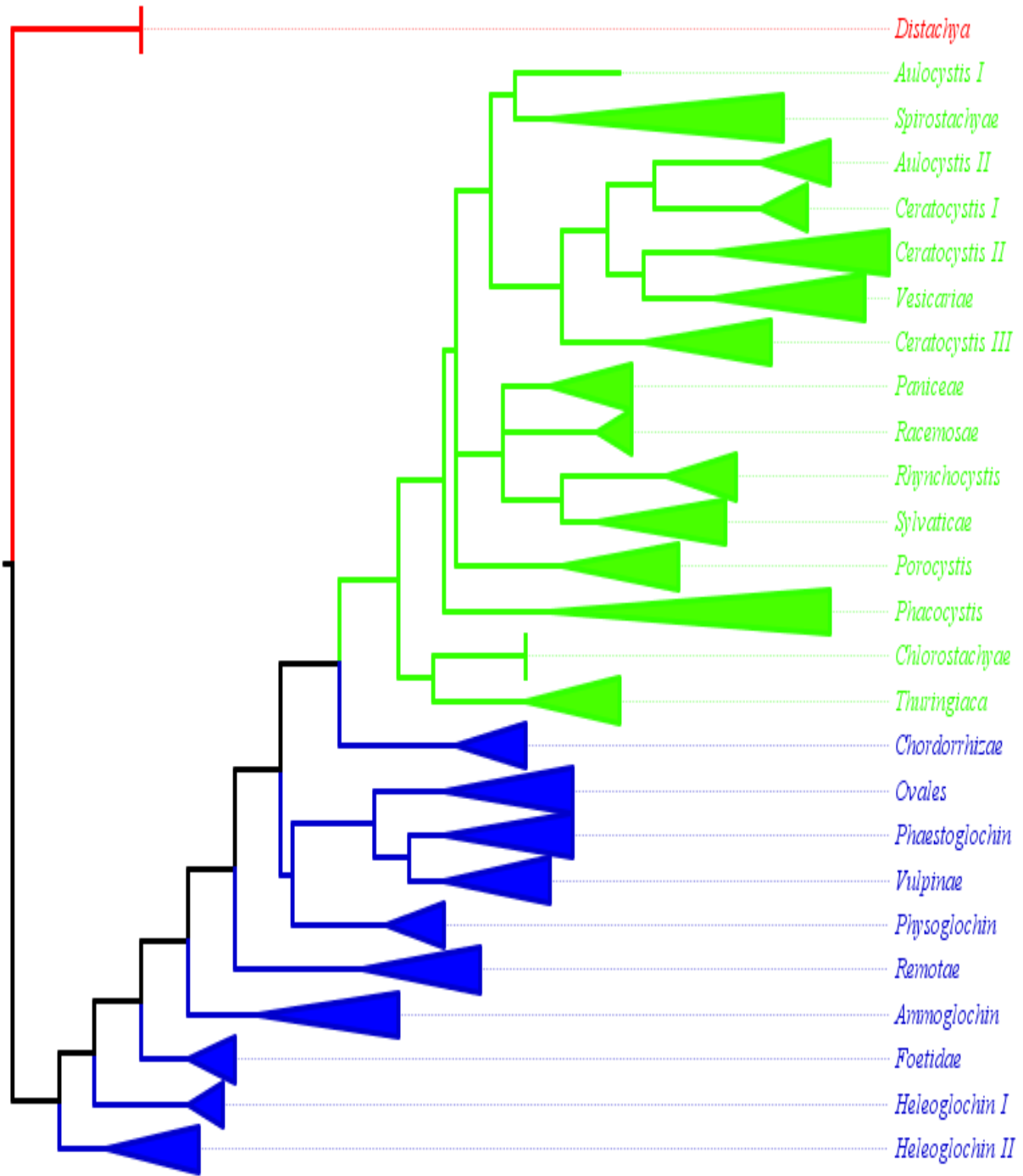
NJ analüüs andis tulemuseks 784 muutussammu pikkuse puu näitajatega $CI=0,1773$; $RI=0,8305$, mis on tervikuna ära toodud lisas 4, koondatud variant joonisel 9. *Vignea* seksioonid paigutuvad trepikujuliselt, tuvastatav on üks suurem, nelja seksiooni ühendav haru; seksioon *Heleoglochin* jaguneb taas kaheks. *Vignea* hulka kuuluv *Chordorrhiza* on sõsarrühmaks tervele *coreCarex*'ile, mille seksioonid klasterduvad kokku. Kaks seksiooni jagunevad mitmeks, vaid ühte liiki sisaldavaks grupiks (*Aulocystis* I – *C. fuliginosa*, II – *C. sempervirens*; *Ceratocystis* I – *C. hostiana*, II – *C. flava*, III – *C. viridula*) ning klaadi sees esineb ka polütoomiat.

Heuristilises otsingus (kestus 02:13:35.8) tuvastati 132 parsimoonsest informatiivset ja 7 mitteinformatiivset tunnust. Isendi tasemel salvestati 5 võrdselt lühikest puud muutussammude arvuga 718 ning näitajatega $CI=0,1936$; $RI=0,8478$. Üks neist on täielikult toodud lisas 5, lühivariant joonisel 10. *Vigne*a seksioonid paigutuvad taas trepikujuliselt, ent moodustavad heuristilisel otsingul kolm klaadi: *Heleoglochin*I+II/*Foetidae*, viit seksiooni ühendav tuumikklaad ning *Ammoglochin*/*Chordorrhizae*. Viimane on ka kogu *coreCarex*'i sõsarrühmaks. *CoreCarex*'is ei esine ei polütoomiaid ega seksioonide jagunemist.

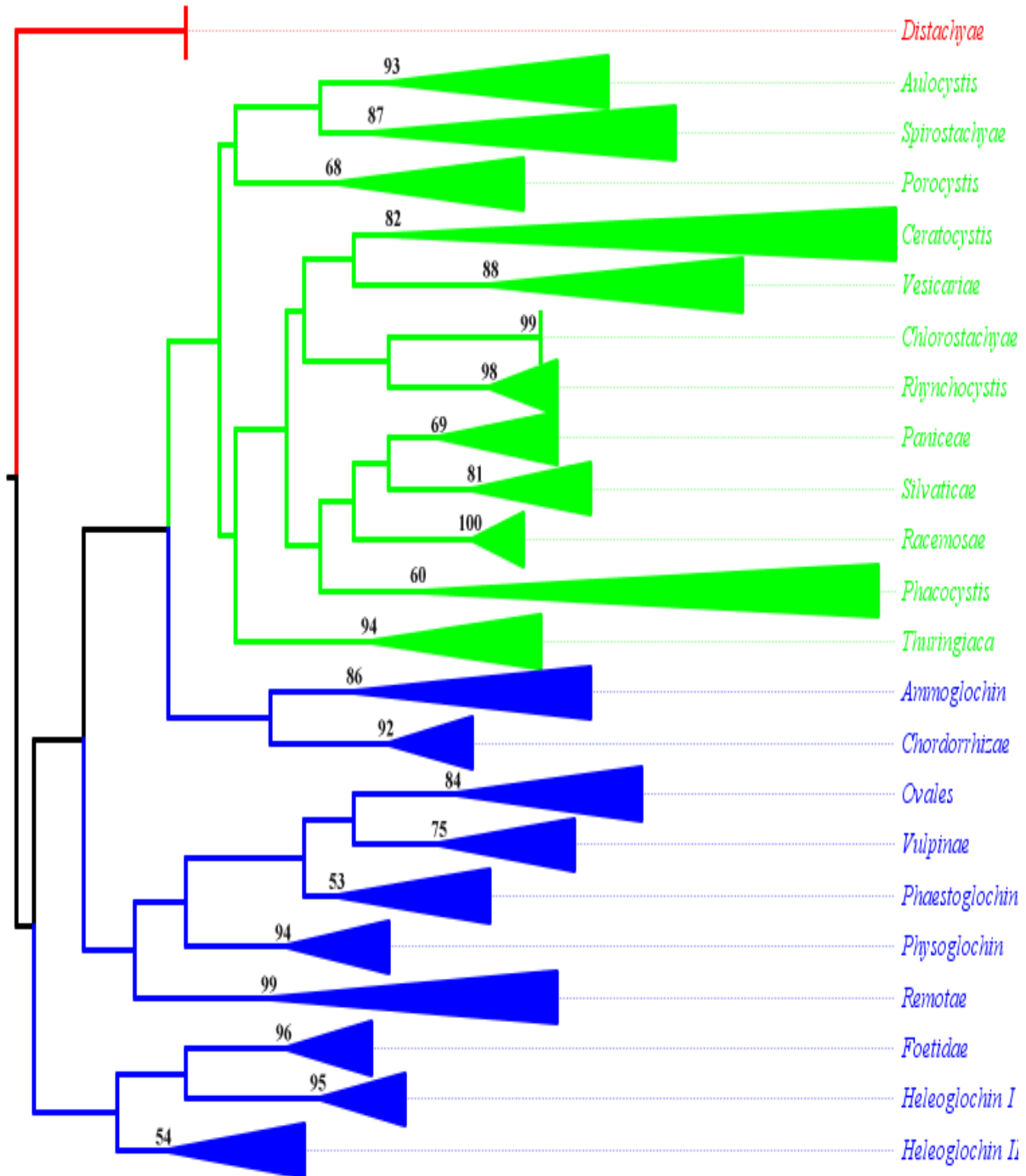
Bootstrap analüüs (kestusega 25:35:13.0) andis tulemuseks dendrogrammi, kus kõigi heuristilisel otsingul tuvastatud seksioonide toetus oli võrdlemisi kõrge (madalaim *Heleoglochin* II – 54%, kõrgeim *Racemosae* – 100%). Seksioonide toetused on joonisel 10 toodud numbriliselt. 50% konsensuspuus jäid paljud harud lahendamata, seega seda töös esitatud ei ole.



Joonis 8. Automaatselt keskkoha järgi juuritud UPGMA puu (PAUP, pikkus 793; CI=0,1753; RI=0,8281). Punane värv tähistab *Caricoid* klaadi, roheline *coreCarex*'it ja sinine alamperekonna *Vignea* seksioone. Rooma numbritega on tähistatud seksioonid, millesse kuuluvad isendid koondatavad ei olnud.



Joonis 9. Eelnevalt määratud välisrühma järgi juuritud NJ puu (PAUP, pikkus 784; CI=0,1773; RI=0,8305). Punane värv tähistab *Caricoid* klaadi, roheline *coreCarex*'it ja sinine alamperekonna *Vignea* seksioone. Rooma numbritega on tähistatud seksioonid, millesse kuuluvad isendid moodustasid puus para- või polüfüleetilisi rühmi ja seega üheks koondatavad ei olnud.



Joonis 10. Üks viiest välisrühma järgi juuritud heuristilise otsingu minimaalse pikkusega kladogrammidest (PAUP, pikkus 718; CI=0,1936; RI=0,8478). Punane värv tähistab *Caricoid* klaadi, roheline *coreCarex*'it ja sinine alamperekonna *Vigneae* seksioone. Rooma numbritega on tähistatud seksioonid, millesse kuuluvad isendid üheks koondatavad ei olnud. Numbrid näitavad seksioonide *bootstrap*-toetusi.

5. Arutelu

5.1 Tunnustatud rühmade feneetiline eristumine

5.1.1 Liigisisene tase

C. flava kompleksi kuuluvat *C. viridula*'t on erinevatel eesmärkidel palju uuritud. Üks olulisematest meetodikatest on sealjuures olnud just isoensüümanalüüs, mida on kasutatud nii liigi geneetilise varieeruvuse hindamiseks, hübriidide tuvastamiseks kui liigisiseste taksonite (alamliigid, varieteedid) piiritlemiseks (Hedren, 2002). Käesolevasse analüüsi kaasati liigisisese taseme varieeruvuse illustreerimiseks 26 *C. viridula* isendit, millest 21 pärinesid samast populatsioonist (vt joonis 5). Nii peakoordinaatanalüüs kui puude topoloogia näitab liigi sees varieeruvust, kusjuures Eesti populatsiooni isendid klasterduvad selgelt kokku, liigi mujalt pärit isendid eraldi. See viitab isoensüümanalüüsi kitsaskohale: populatsioonigeneetiliste uuringute jaoks ei pruugi see meetod sobida. Kuna enamus varieeruvusest tulenes populatsioonidevahelisest komponendist, tuleks järelkult liigi mitmekesisuse adekvaatseks hindamiseks kaasata analüüsi palju ning võimalikult suure geograafilise regiooni populatsioone, nagu on tehtud käesolevas analüüsis, kus taimed pärinevad väga erinevatest Euroopa osadest.

Paljude juhtudel jäi isendite omavaheline paiknemine lahendamata ning esitati puudes polütoomiatena. Selle põhjus võib olla sama päritoluga ehk siis potentsiaalselt lähisugulasisendite kaasatus analüüsi (mõne teise isendiga identsete tunnustega isendeid oli kokku 31) või üldine madal liigisisene varieeruvus isoensüümtunnustes, mis toetab hüpoteesi, et see analüüs sobib eelkõige liigist kõrgemate taksonite uurimiseks.

Osade liikide puhul (*C. cuprina*, *C. distans*) oli selgelt tuvastatav isendite kahte suuremasse gruppi jagunemine. Isoensüümtunnused toetavad seega *C. distans*'i puhul DNA-markerite põhjal eristatud kahe alamliigi *C. distans subsp. oranensis* ja *subsp. distans* eksisteerimist. *C. cuprina* liigisiseste taksonite olemasolu hetkel ei tunnista, kuigi teadlased on seda eri aegadel ka välja pakkunud (eMonocot Team Cyperaceae, 2015). Kuna sarnase varieeruvuse mustriga olid ka *C. cuprina*'le lähedase seksiooni *Phaestoglochin* liigid, on põhjust arvata, et tegemist on mitte liigisiseste taksonite eksistentsi, vaid mingi muu parameetri (epigeneetika, geograafilise päritolu vm) lõhestava mõju või valimi ebapiisava esindatusega.

5.1.2 Liikide tase

Liigi tasemel moodustavad kõik isendid kõigis analüüsides (Tukey, PcoA, dendrogrammid) eristuvaid ja kõrge toetuse või statistilise olulisusega klastreid. Isendite säärane tugev klasterdumine on kooskõlas varasemate uuringutega, mis on piiratud populatsioonide või liikide puhul isoensüüme uurides tuvastanud väga madala polümorfisuse taseme (Micales ja Bonde, 1995; Kull ja Oja, 2007).

C. aggregata oli ainus liik, mille isendid UPGMA ja NJ analüüsides puhul teistest liikidest täiesti eralduvat rühma ei moodustanud, vaid paigutusid sama sektsiooni teiste liikide isenditega läbisegi. Selle põhjuseks võib olla antud sektsiooni (*Phaestoglochin*) liikide evolutsiooniliselt hiline lahknemine, mille tõttu need ei ole hetkel üksteisest selgelt eristatavad. Teiseks põhjenduseks võiks olla eraldi paigutunud isendite hübriidne staatus, mis Jermy et al. (2007) andmetel selles sektsioonis esineb, kuid eriti sage ei ole.

Huvitava pildi andis ka üks *C. nigra* isend, mis paigutus klasteranalüüsides teistele sama liigi isenditele ning *C. acuta*'le sõsarrühmaks. Põhjenduseks võib siin olla sektsioonis *Phacocystis* sage hübriidiseerumisnähtus ning sarnasusest lähtudes võiks selle isendi näol tegu olla *C. nigra* ning *C. acuta* hübriidi ehk *C. x elytroides*'ga (Jermy et al., 2007).

Liigi tasemel tuvastatud privaatsed alleelid (33 tk) võimaldavad antud uuringutes sisalduvatest 32 liigist eksimatult eristada 19 ehk üle 50%. Tuleb aga arvestada, et üksteisega väga lähedasi sugulasliike oli analüüsis küllaltki vähe, mistõttu mahukama valimiga uuringus samale tulemusele jõuda ei pruugita. Samas, sugulasliikide *C. flava*, *C. hostiana* ning *C. viridula* puhul kahes viimases ning ka samasse sektsiooni kuuluvate *C. acuta* ja *C. nigra* puhul tuvastati privaatsete alleelide olemasolu, mis pigem viitab sellele, et piisava arvu ensüümlookuste uurimisel eksisteerivad ja on eristatavad privaatsed alleelid ka fülogeneetiliselt lähedaste liikide puhul. Liigipaari *C. arenaria* ja *C. pseudobrizoides* ning kolmiku *C. aggregata*, *C. divulsa* ja *C. spicata* näol on privaatsete alleelide mitteleidmine oodatav, kuna tegu on fülogeneetiliselt väga lähedaste liikidega, mida kinnitas ka käesolev töö.

5.1.3 Sektsioonide tase

Koguarieeruvusest veidi alla poole pärines sektsioonide seest, ülejäänud eri sektsioonide vahelistest erinevustest, mis annab alust pidada isoensüümanalüüsi sektsioonide eristamiseks

sobivaks meetodiks. Tõepoolest, Tukey test ei tuvastanud võimalikest 131 sektsioonide paarist statistiliselt olulist erinevust vaid 20 juhul (15%), millest 9 paari olid *Vignea* või *Caricoid* klaadide sektsioonid ning 11 kuulusid *coreCarex*'i klaadi. Esines ka paare, mille erinevuse statistiline toetus jäi vaid veidi alla kriitilise piiri, nagu näiteks *Chlorostachyae* ja *Spirostachyae*. Mitmetel juhtudel (eriti *Distachya*, *Chlorostachyae* ja *Chordorrhizae* puhul) võib eeldada, et tuvastatud madal eristusvõime võis tuleneda analüüsi kaasatud väikesest arvust isenditest. Kui neid kolme sektsiooni sisaldavad 10 paari arvestamata jätta, jäävad statistiliselt olulisel tasemel eristamatuteks vaid 10 paari (3 *Vignea*'st, 7 *coreCarex*'ist), mille põhjuseks võib olla näiteks grupi kiire evolutsiooniline diversifikatsioon.

Klasteranalüüsides grupeerusid ühe sektsiooni liigid kokku peaaegu kõigil juhtudel välja arvatud *C. fuliginosa* ja *C. sempervirens* ning *C. viridula* + *C. hostiana* ja *C. flava* (NJ puhul) ning *C. diandra* ja *C. paniculata* (nii UPGMA kui NJ puhul). Hetkeks kladistikasse põigates võib väita, et sektsiooni *Heleoglochin* puhul on selle lahknemise põhjuseks korduvates analüüsides tuvastatud, ent seni üldtunnustatud süsteemis parandamata parafüleetilisus (Waterway *et al.*, 2009). Teiste tuvastatud anomaaliate põhjuseks võib olla vale liigimäärang või ensümogrammide interpreteerimine, kuid tõenäolisem tundub seletus, et tegu võib olla hübriidiseerinud liigi või liikidega, kuna analüüsitud taimmaterjali kasvatamiseks kasutatud seemned pärinevad botaanikaaedadest, kus taimed kasvavad koos paljude teiste liikide esindajatega. Sektsiooni *Aulocystis* puhul on tunnuste suurt varieeruvust ning liikide mitmeks grupiks jaotuvmist tuvastatud ka teiste meetoditega (Lipnerova *et al.*, 2013), mis võib samuti viidata selle parafüleetilisele olekule.

Keskmine sektsioonides (ja ka liikides) leitud alleelide arv varieerus suurel määral (vt joonis 2), kõrgeim oli see sektsioonides *Ceratocystis*, *Phacocystis* ja *Heleoglochin*, põhjused selleks on nende kolme puhul aga erinevad. *Heleoglochin*'is seletab nähtust juba eelpool käsitletud parafüleetilisusest tulenev varieeruvus. Sektsioonis *Ceratocystis* leitud kõrge varieeruvuse (ja ka privaatsete alleelide rohkuse, vt joonis 2) põhjus võib osaliselt tuleneda statistilisest veast. Nimelt oli selles sektsioonis uuritud isendite hulk teistega võrreldes tunduvalt kõrgem. On loogiline oletada, et juhusliku suurema valimi korral leitakse suurem varieeruvus, kui juhusliku väikse valimi puhul (Tyler, 2003). Autor arvestab, et edasistes töödes tuleks sellised näitajad uuritud isendite arvu kohaselt standardiseerida. Sektsiooni *Phacocystis* sisene suur varieeruvus tuleneb peamiselt liigi *C. nigra* isendite suurest erinevusest. Seda liiki on erinevates käsitlustes ka mitut moodi

alamliikideks jaotatud, mis tuvastatud suurt varieeruvust seletada võib. Kindlaid järeldusi selle kohta ei saa tuua, kuna nagu eespool selgitatud, ei ole isoensüümanalüüs liigisest taksonite eristamise parim meetod ning sellest tulenevalt alamliike käesolevas analüüsis eraldi ei käsitletud.

Privaatseid allelele oli sektsiooni tasemel 36 ja need võimaldasid omavahel eristada 17 sektsiooni ehk 77% uuritud sektsioonidest. Siin, nagu ka liigi puhul tuleb ära märkida, et suurema hulga ja/või põhjalikumalt esindatud sektsioonide kaasamine analüüsi võib eristatavate sektsioonide osakaalu nii tõsta kui langetada. Eristatavus võib tõusta, kuna analüüsis tuvastatavate alleelide koguarv tõuseb ja seega tõuseb ka tõenäosus, et mõned neist lisaallelelidest on mingile kindlale rühmale unikaalsed. Samas võib eristatavus hoopis langeda, kuna valimi esinduslikumaks muutmisel on tõenäoline, et leitakse rühmi, millel esinevad samad alleelikombinatsioonid.

5.1.4 Alamperekondade (klaadide) tase

PcoA ning UPGMA näitasid alamperekondade jaotuses identset pilti: *Vignea* ning *coreCarex* on üksteisest selgelt eristunud, mis on kooskõlas teiste kaasaegsete uuringutega. Madalad seletuvusprotsendid PcoA analüüsidel (kolme esimese telje kumulatiivne seletusvõime jäi alla 40%) näitlikustavad aga isoensüümanalüüsi lookuste sõltumatust – 16 kasutatud lookust näitasid igaüks niivõrd unikaalset varieeruvuse mustrit, et neid ühtsete koordinaatide alla koondada oli keeruline.

Caricoid klaadi isendid klasterduvad *Vignea*'ga kokku. Kuna need klasteranalüüsid võrdlevad vaid tunnuste sarnasust (ega tuvasta fülogeneesi), tuleb järeldada, et *Caricoid* ja *Vignea* klaadid on üksteisest isoensüümtunnuste alusel eristamatud. Sellesse tulemusse tuleb suhtuda aga kriitiliselt, kuna tegu võib siin olla nii isendite alaesindatusest tuleneva näilise sarnasuse kui väärast liigimääranguga. *Caricoid* ja *Vignea* klaade feneetiliselt käsitlevaid isoensüümandmetel põhinevaid varasemaid analüüse võrdlemiseks autoril leida ei õnnestunud, kuid lähtudes põhimõttest, et fülogeneetiline süsteem, mida on nende kahe puhul uuritud (kuigi mitte isoensüümidega), peegeldub ka rühmade sarnasuses, peaks *Caricoid* ning *Vignea* siiski üksteisest eralduma.

Kogu tuvastatud varieeruvusest seletas alamperekondade sisene komponent ära enamuse (77%), jättes nende üksteisest eristamiseks vaid küllaltki väikese osa. Samas võib selline jaotus suuresti olla tingitud juba eespool käsitletud *Vignea-Caricoid* probleemistikast.

5.2 Perekonna *Carex* fülogenees

5.2.1 Hinnang heuristilisele otsingule

Alamperekondade tasemel jälgis heuristilise otsingu tulemus üldjoontes feneetikaosas juba kirjeldatud mustreid: *coreCarex* moodustas monofüleetilise rühma, *Vignea* paiknes sellest basaalsemalt, kusjuures tuvastatavad olid mitmed suuremad klaadid. *Caricoid* klaadi paigutus jääb siinkohal lahtiseks, kuna kirjandusel põhinedes kasutati seda vaikimisi välisrühmana, mis aga *Caricoid*'i tegelikku paigutust hinnata ei võimaldanud. On tõenäoline, et fülogeneetiliselt kaugema taksoni kasutamine korrektse välisrühmana oleks analüüsi täpsustanud. Hetkel analüüs taksoneid kõige uuemale kirjandusele vastavaks kolmeks suureks (üksteist mittehõlmavaks) klaadiks ei jaotanud. Kuna see süsteem põhineb aga DNA-meetoditel saadud tulemustel, on siinkohal võimalus, et isoensüümide ning teistes uurimustes kasutatud markerite evolutsiooni kulg on olnud erinev.

Kõigi käesoleval andmestikul saadud puude püsivusindeks CI oli suhteliselt madal, mis viitab üldiselt kõrgele homoplaasiale ja tunnuste muutumise sagedusele. See toetab arvamust, et isoensüümid on neutraalsed markerid ning et kõik säilinud elektroforeetilised variandid on võrdselt kohased, kuna kladistilisel analüüsil ei ole muutuste osas tuvastatav ükski eelistatud suund. Siiski peab arvestama, et CI väärtus langeb, kui taksonite ja tunnuste arv (käesolevas analüüsis vastavalt 256 ja 139) tõuseb, seega võib tuvastatud madal CI väärtus olla eksitav.

95% statistilise olulisuse saavutamiseks peaks *bootstrap*-analüüsi vastavad toetused jääma 88 ja 100 vahele (Waterway *et al.*, 2009). Käesolevas analüüsis jäid heuristilise analüüsi sektsioonide toetused suuremalt jaolt sellesse vahemikku, millega on ühe sektsiooni liikide (erandiks *Heleoglochin*) monofüleetilisus hästi põhjendatud. Sektsioonide omavahelise paigutuse ning hargnemise toetused jäid aga tunduvalt madalamaks või jäi hargnemine polütoomseks. Selle põhjuseks võivad olla nii mõned üksikud taksonid (liigid), mis liiguvad korduste käigus puus piisavalt, et ka muidu hästi eristuvate klaadide toetusi madalana näidata (*rogue taxa*) (Hinchliff ja Roalson, 2013), kõrge homoplaasia tase fülogeneetilises puus kui ka väike valim.

5.2.2 Rõhuasetused alamperekonnas *Vignea*

Sektsiooni *Heleoglochin* kuuluvad *C. diandra* ja *C. paniculata* asetused kõigis analüüsides kõigi parameetrite puhul üksteisest eraldi, mis on tugevaks tõendiks sektsiooni polüfüleetilisusest.

See on kooskõlas Waterway *et al.* (2009) DNA-markereid kasutades saadud tulemustega. Seetõttu tuleks sektsiooni käsitlust monofüleetilisusel põhineva süsteemi loomiseks muuta.

Isendipuud (lisa 5) vaadates eristub oma isendeid toetavate harude pikkuselt ehk muutussammude arvult teistest liikidest selgelt *C. nigra*. Selline topoloogia võib viidata nii pikaajalisele muutuste kuhjumisele kui väga kiiretele mitmekordsetele mutatsioonidele. Kirjanduse andmetel on sektsioon *Phacocystis* hilise eristumisega ning hetkel aktiivselt mitmekesisumas (Escudero *et al.*, 2012b). Liiki on seetõttu jagatud ka alamliikideks ja varieteetideks.

5.2.3 Huvipunktid *CoreCarex*'i klaadis

Hetkel morfoloogial põhinevates süsteemides (Kükenthal, 1909; Jegorova, 1999) eraldi sektsioonidesse kuuluvate *C. sylvatica* ja *C. pendula* puhul on DNA-markerite alusel tuvastatud sugulus, mistõttu on tehtud ettepanekuid need kaks (nomenklatuurse primaarsusprintsii bi alusel) liita sektsiooniks *Rhynchocystis* (Waterway ja Starr, 2007; Waterway *et al.*, 2009). Isoensüümanalüüsis olid need liigid sama haru poolt toetatud küll feneetika põhjal, aga fülogeneetilises otsingus ühte klaadi ei moodustanud. Seega toetavad käesoleva töö tulemused siin kahe erineva sektsiooni säilitamist, seda enam, et viidatud töödes kasutatud andmestikus sisaldus nende kahe potentsiaalseid sugulasliike vähem, kui käesolevas, mis lihtsustab näilise monofüleetilise klaadi teket.

Huvi pakkus ka sektsiooni *Ceratocystis* liikide paiknemine. Kirjanduse andmetel on *C. viridula* ning *C. flava* üksteisega lähedalt suguluses ning kuuluvad koos mõne teise liigiga *flava* kompleksi (Hedren, 2002). Käesolevas analüüsis osutus *C. flava* aga *C. viridula*'t ja *C. hostiana*'t ühendava klaadi sõsarrühmaks. Kuna sektsioonis on teada väga sage liikidevaheline ristumine (Jegorova, 1999), võib see tulemus olla põhjustatud kas ajaloolisest või ka lähiaja hübriidisatsioonist (ja/või introgressioonist).

Sektsioone *Ceratocystis* ja *Spirostachya* on kirjanduse andmetel nii morfoloogilistel tunnustel kui hübriidiseerumisvõime tõttu lähisugulasteks peetud ning tehtud ka ettepanekuid nende liitmiseks (Hedren, 2002; Jermy *et al.*, 2007). Isoensüümtunnuste alusel seda toetada ei saa, kuna sektsioonid paigutuvad puus selgelt eraldi. *Ceratocystis*'e sõsarklaadiks osutus hoopis *Vesicariae* ning *Spirostachya*'le sektsioon *Aulocystis*.

5.3 Töö käigus tekkinud tähelepanekud

Isoensüümid võimaldavad tuvastada ja võrrelda isendite homo- või heterosügootsust uuritud ensüümilookuste osas. Analüüsist selgus, et tarnaperekonnas on erinevate lookuste sügootsuse aste väga varieeruv: $H_o=0,004$ (MDH B) kuni $H_o=0,408$ (PGM A). Kuna tegu ei olnud stohhastilise valimiga populatsioonidest, ei saa siinkohal teha järeldusi liikide inbriidingu, efektiivse alleelide arvu vm kohta, küll aga saab nentida, et homo- ja heterosügootsuse tase sõltub oluliselt uuritavast lookusest ning teiste allikate (Hedren, 2002; Kull ja Oja, 2010; Talve *et al.*, 2012) andmetel ka konkreetsest taimerühmast. Seda tuleks arvestada ka populatsioonigeneetiliste uuringute puhul.

Kuigi läbi töötatud suuremahulistest fülogeneetilistest artiklitest ei õnnestunud tuvastada ühtegi, mille tulemused oleksid isoensüümmeetodil saadutega identsed, oli osaline kooskõla mõnega neist (Lipnerova *et al.*, 2013) ilmne. Mitteühtiv osa võib tuleneda valimite suuruste või esindavuse küsimustest või kasutatud markerite erinevast fülogeneesi käigust. Seega tuleks rõhuda erinevate markersüsteemide ühendamisele.

5.4 Võrdlus DNA meetoditega ning hinnang isoensüümanalüüsile

Isoensüümanalüüsi kui juba üle poole sajandi edukalt kasutatud ja seega põhjalikult välja töötatud metoodika hindamiseks on seda järgnevalt võrreldud märksa uuemate DNA-meetoditega. DNA-meetoditelt oodati kasutuselevõtu algusaastatel kõigi süstemaatikat puudutavate probleemide kiiret lahendamist. Tänapäevaks ilmnenu DNA-markerite puuduste tõttu on aga nii mõnedki uurijad taas vähemalt pilootuuringute puhul isoensüümide poole pöördumas (Goemoery *et al.*, 2013; Glasenapp *et al.*, 2014).

Tihti tuuakse DNA-meetodite eeliseks kasutatavate neutraalsete tunnuste rohkus (iga aluspaar on põhimõtteliselt analüüsis käsitletav sõltumatu tunnusena). Töös kirjeldatud isoensüümtunnustel põhineva analüüsi heuristilises otsingus tuvastati 132 parsimooniselt informatiivset tunnust (ehk ligi 95% andmematriksis sisaldunutest). Sama näitaja jääb DNA-põhistes analüüsides 40% ringi (Starr *et al.*, 2004; Starr *et al.*, 2008), mistõttu tunnuste kogus iseenesest analüüsi võimekust ei näita. Lisaks võimaldab ensüümanalüüs alati heterosügootsete isendite identifitseerimist, mis ei ole tõsi kõigi DNA-markerite puhul (Mondini *et al.*, 2009).

Kuigi isoensüümide põhjal koostatud andmetabelites oli üsna kõrge protsent puuduliku infoga isendeid või lookuseid, suudavad kasutatud programmid õige märgistuse korral (Swofford,

2003) seda arvestada ning analüüsi tulemused ega puude topoloogia sellest oluliselt ei muutu. Käesoleva analüüsi põhjalikkust illustreerib fakt, et uuritud ensüümide puhul õnnestus tuvastada 98% kirjanduse andmetel eraldatavatest lookustest (ülevaade on toodud tabelis 3, varieeruvusega ensüümide nagu ADH, EST ja SKD puhul on saadud tulemust võrreldud kirjanduse andmetel keskmise hinnanguga). Ainsaks erandiks oli ensüüm PGD, kus ilmus vaid üks lookus kahest potentsiaalsest. Samuti olid tuvastatavad mitmed mingile kindlale rühmale ainuomased privaatsed ensüümialleelid, mis neid rühmi üheselt eristada võimaldasid.

Kuna taimse materjali kogumisest isoensüümanalüüsi visualiseeritud tulemuse nägemiseni on võimalik jõuda ühe tööpäevaga (Micales ja Bonde, 1995; Lee *et al.*, 2002), on selge, et ajakulu on sellel meetodil enamiku DNA-meetoditega võrreldes palju väiksem. Isoensüümanalüüs on läbi viidav sisuliselt igas bioloogialaboris, ei vaja spetsiifilist kallist aparatuuri ning vajalike kemikaalide hind ei ole kõrge, mistõttu on isoensüümanalüüsi kulu madal ja seega on tegemist sobiva meetodiga väiksematele ja piiratud ressurssidega töörühmadele. Lisaks ei vaja see, erinevalt mitmetest DNA-meetoditest, mingit eelteadmist uuritava liigi genoomist (Glaserapp *et al.*, 2014) ja on seega intuiitiivselt sobilik väheuuritud taimerühmade puhul kasutamiseks.

Peamiseks isoensüümmeetodi piiranguks on vajadus värske, soovitatavalt ühisaia tingimustes kasvanud taimmaterjali järele, kuna sel juhul on ensüümid aktiivsed ja alleelsed variandid eraldatavad ning omavahel kõige paremini võrreldavad. Vananenud taimmaterjali korral võib ensüümogrammide selgus ja seega interpreteeritavus kannatada, mittehomogeensetest tingimustest pärit proovide puhul tuleb arvestada, et osade keskkonnast sõltuvate ensüümide aktiivsus võib olla muutunud (Wendel ja Weeden, 1989a), mis võib viia tulemuste väära kodeerimiseni. Esimesel juhul võib suure puuduva info osakaaluga analüüs anda valenegatiivse tulemuse – taksonid, mis tegelikult eristuvad, jäävad märkimata. Teisel juhul on tõenäoline pigem valepositiivse vea esinemine – sama taksoni esindajad tunduvad ensüümogrammil eristuvat, kuigi nad seda reaalsuses ei tee.

Esineb ka probleeme, mis on isoensüümanalüüsil ning DNA-meetodite puhul ühised: algse materjali liigimääratluse kaheldavus (kuna seda toimetatakse sageli morfoloogilistest tunnustest lähtudes (Tyler, 2003)), ajakulu meetodika rakendamiseks piisava vilumuse omandamiseks ning vajadus meetod konkreetsele taimerühmale sobivaks kohandada (isoensüümanalüüsi puhul

geelelektroforeesi lahuste süsteemi, DNA-markerite puhul praimerite vm välja töötamine ja optimeerimine).

Uurimuse käigus ilmnes, et identse alginfo baasil genereeritavate puude topoloogia sõltub ensüümmarkerite kasutamisel olulisel määral kasutatavast programmist, parameetritest, puuduva info käsitlest, lõppanalüüsis kasutatavate isendite valikust jne. Kuna samadele tulemustele on jõutud ka DNA-markerite kasutamisel, ei saa seda kasutada põhjendusena viimaste eelistamiseks isoensüümanalüüsi ees. Näiteks nentisid viimaste aastate kõige mahukama tarnade süstemaatikat käsitleva töö autorid Waterway et al. (2009), et analüüsiks valiti 400 liigist välja 140, mis nende eelneva süstemaatilise jaotuse eeldusega kokku sobisid; Starr et al. (2008) esitasid aga ühe artikli raames kolm erineva topoloogiaga erinevate molekulaarsete markerite põhjal tehtud fülogeneesipuud ja seda mitte spetsiifilisel liigi või sektsiooni tasemel, vaid kõige robustsemal klaadide tasemel.

Lisaks, nagu Conte et al. (2008) ja Lee et al. (2002) näitavad, ei erine isoensüümanalüüsi ning DNA põhjal läbi viidud populatsiooni geneetilise struktuuri ning mitmekesisuse uuringu tulemused märkimisväärselt. Käesolevas töös ilmnenu algeelse varieeruvuse kõrgest tasemest lähtudes võiks sarnast tulemust ennustada ka põhjalikele sektsiooniülestele süstemaatilistele uuringutele tarnaperekonnas. Sellele väitele empiirilise toetuse leidmiseks tuleks sama algmaterjali põhjal läbi viia ka DNA-markeritel baseeruv analüüs. See ei olnud magistritöö raames võimalik ning seetõttu jäävad eraldatud DNA-proovid edasisi uuringuid ootama.

Eelnevat kokku võttes võib väita, et feneetiliseks süstemaatikaks on isoensüümid DNA-meetoditega võrreldaval tasemel või oma väikse ressursikulu tõttu isegi eelistatud. Et sama saaks väita tarnasektsioonide kladistilise paigutamise kohta, oleks vaja jätkata uuringuid nii keeruliste liigikompleksidega kui kõrgematel hierarhilistel tasemetel, ning võimalik, et tõsta valimi suurust ja esindavust. Sealjuures tuleks perekonnas esinevat kõrget hübriidiseerumise taset arvestades eelistama markerite valikust hoolimata fülogeneetiliste võrkude metoodikat (Gehrke *et al.*, 2010).

6. Kokkuvõte

Nagu Hinchliff ja Roalson (2013) veenvalt näitasid, sobivad erinevad molekulaarsed markerid väga erineva hierarhilise taseme süstemaatilisteks uuringuteks. Isoensüümidega on tarnade puhul peamiselt uuritud sektsioonisisese taseme varieeruvust ning liikide sugulust. Käesolev magistritöö on esimene, mis kasutab isoensüümanalüüsi perekonna *Carex* kõrgemal tasemel, püüdes eristada nii liike, sektsioone kui kõrgema taseme klaade, millest osad vastavad alamperekonnale. Töö peamiseks eesmärgiks oli isoensüümtunnuste alusel uurida taksonoomiliselt keerulise perekonna sektsioonideks jagunemist ja võrrelda seda traditsioonilise morfoloogilise ning uuemate DNA-markeritel põhinevate klassifikatsioonidega. Seega täidavad tulemused lünga erinevatel meetoditel tarnade kohta saadud informatsioonimaatriksis ning neid saab potentsiaalselt kasutada suuremahuliste metaanalüüside läbiviimiseks.

Analüüsi 32 liiki kuuluvate 252 isendi 16 erinevat isoensüümlookust (139 erinevat alleeli) nii statistiliste (Tukey HSD), feneetiliste (UPGMA, NJ) kui ka kladistiliste (heuristiline säästuprintsiibi otsing) meetoditega ning tuvastati selged varieeruvuse mustrid, mis mõne rühma puhul, nt alamperekonna ja liigi tasemel, lähevad kirjanduse andmetega hästi kokku. Sektsioonideks jaotumise muster on erinevate uuringute andmetel kasutatud tunnustest sõltuvalt niivõrd varieeruv (vt nt viited jooniselt 1 ja (Jegorova (1999))), et üksühest kokkulangevust ühegi varasema tulemusega ei tuvastatud, osalist kooskõla aga ilmnes paljudega. Vastuolulised momendid sektsioonide tasemel illustreerivad tarnade fülogeneesi ning taksonoomia keerukust ja vajavad edaspidistes töödes täiendavat uurimist ja selgitamist.

Käesolev analüüs ning arutelu näitavad, et isoensüümanalüüs ei ole DNA-meetodite kõrval oma olulisust endiselt minetanud. Olles piisavalt täpne ning majanduslikult soodne meetod, sobib see liikide ning sektsioonide tuvastamiseks vähemalt tarnaperekonnas, uuritud kirjanduse kohaselt ka teiste taimerühmade puhul. Lahtiseks jääb veel küsimus meetodi sobilikkusest sektsioonist kõrgemal tasemel fülogeneetilise süsteemi loomisel, mille selgitamiseks oleks otstarbekas viia sama materjali põhjal läbi ka mõni DNA-tunnustel põhinev, näiteks mikrosatelliit-analüüs.

Perekonna *Carex* süstemaatikat käsitlevate ja omavahel kohati vastuoluliste hüpoteeside rohkusest tingitult tuleb tarnade, nagu ka kogu muu eluslooduse süstemaatikat, uurida erinevate kättesaadavate meetodite ja markeritega, sealhulgas isoensüümide abil, ning põhjanevaid järeldusi ja üldistusi teha vaid neid kõiki koondava metaanalüüsi tulemuste põhjal.

THE DISTINGUISHABILITY OF THE SPECIES OF GENUS *CAREX* INTO TAXONOMIC SECTIONS USING ISOENZYME MARKERS

Hedi Pedajas

7. Summary

As it has been convincingly shown, when it comes to the systematics of different hierarchical levels, best results are often obtained by using different molecular markers. Thus far isoenzymes have been used to test the genetic variability and phylogeny of the species belonging to the genus *Carex* only on the inter-section level. The present thesis is the first work to use isoenzyme analysis on a higher hierarchical level. It looks into distinguishing both species and taxonomic sections as well as higher clades (some of which have been annotated the subgenus rank). The main aim of the thesis is to use enzyme markers to research the division of the taxonomically complex genus into sections and compare the results with those of the classical morphotypological methods and newer DNA-based systems. The results will therefore fill the gap in the information matrix about *Carex* and can potentially be used in large-scale meta-analysis.

252 specimens belonging to 32 species were analysed for 16 different isoenzyme loci (139 alleles) using statistical (Tukey HSD), fenetic (UPGMA, NJ) and phylogenetic (heuristic search with the maximum parsimony criterion) methods. Clear variation patterns were discovered which for some levels (e.g. species and subgenus level) were highly compatible with prior results described in various studies. Sections delimitations in the genus have been highly variable throughout research (references given in text). Our results add to the growing list of possible hypothetical systems as a full congruence with none of the systems proposed by other authors could be found. However, partial compatibility with much of earlier research was found. The controversies illustrate the complexity of the phylogeny of sedges and indicate the need for further research and clarification.

The analysis and discussion clearly show that the isoenzyme analysis has not lost its usefulness when compared to the newer DNA-based methods. Being relatively cheap, fast and giving results largely congruent to those obtained via newer methods, the methodology is, in our opinion, suitable for distinguishing species and sections in the genus *Carex*. Based on the newer results from other researchers, isoenzyme analysis yields similar results also in other plant groups.

The question concerning the usage of isoenzyme analysis to construct higher level phylogenetic hypothesis in *Carex* cannot be satisfactorily answered based on this thesis alone. Therefore further research using DNA-markers (e.g. microsatellites) is needed, preferably using the same source material used for the present study.

The plethora of incongruent hypothesis concerning the systematics and phylogeny of the genus *Carex* is an indicative reminder that sedges as well as all living nature should be investigated using every and all available methods and markers including isoenzymes. All generalizations, including those concerning the systematics of a group, therefore, should be made only by conducting precise meta-analysis on all of the obtained data.

8. Tänuavaldused

Suur tänu igakülgsete nõuannete, õlalepatsutuste ja lakkamatu motiveerimise eest austatud juhendaja Tatjana Ojale. Tänusoovid ka kannatlikele lähedastele ja alati abivalmis tööühmale.

9. Kasutatud kirjandus

Blackstock, N., Ashton, P.A., 2010. Genetic markers and morphometric analysis reveal past hybridization and introgression in putative *Carex flava* L. s.str. (Cyperaceae) hybrid populations. *Plant Systematics and Evolution* 287, 37-47.

Bruederle, L., Yarbrough, S., Fehlberg, S., Naczi, R., Ford, B., 2008. Allozyme variation in the genus *Carex*... 15 years later: 1986-2001. *Sedges: uses, diversity and systematics of the Cyperaceae*, 187-196.

Bryson, C.T., Carter, R., Naczi, R., Ford, B., 2008. The significance of Cyperaceae as weeds. *Sedges, uses, diversity, and systematic of the Cyperaceae*, Missouri: Monogr Syst Bot Mo Bot Gard 108, 15-101.

Bures, P., Zedek, F., 2014. Holokinetic drive: centromere drive in chromosomes without centromeres. *Evolution* 68, 2412-2420.

Conte, R., Dos Reis, M.S., Mantovani, A., Vencovsky, R., 2008. Genetic structure and mating system of *Euterpe edulis* Mart. populations: A comparative analysis using microsatellite and allozyme markers. *Journal of Heredity* 99, 476-482.

Dabros, A., Waterway, M., Naczi, R., Ford, B., 2008. Segregation of sedge species (Cyperaceae) along environmental gradients in fens of the Schefferville region, northern Quebec. *Sedges: uses, diversity and systematics of the Cyperaceae*, 145-161.

eFloras, 2008. eFloras.org Flora of North America, Missouri Botanical Garden, St. Louis, MO & Harvard University Herbaria, Cambridge, MA.
http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=1&taxon_id=105644 (accessed 2015-04-29).

eMonocot Team Cyperaceae, 2015. <http://cyperaceae.e-monocot.org> (accessed 2015-04-12).

Escudero, M., Hipp, A.L., Hansen, T.F., Voje, K.L., Luceno, M., 2012a. Selection and inertia in the evolution of holocentric chromosomes in sedges (*Carex*, Cyperaceae). *New Phytologist* 195, 237-247.

Escudero, M., Hipp, A.L., Luceno, M., 2010a. Karyotype stability and predictors of chromosome number variation in sedges: A study in *Carex* section *Spirostachyae* (Cyperaceae). *Molecular phylogenetics and evolution* 57, 353-363.

Escudero, M., Hipp, A.L., Waterway, M.J., Valente, L.M., 2012b. Diversification rates and chromosome evolution in the most diverse angiosperm genus of the temperate zone (*Carex*, Cyperaceae). *Molecular phylogenetics and evolution* 63, 650-655.

Escudero, M., Maguilla, E., Loureiro, J., Castro, M., Castro, S., Luceno, M., 2015. Genome size stability despite high chromosome number variation in *Carex* gr. *laevigata*. *American Journal of Botany* 102, 233-238.

Escudero, M., Valcarcel, V., Vargas, P., Luceno, M., 2010b. Bipolar disjunctions in *Carex*: Long-distance dispersal, vicariance, or parallel evolution? *Flora* 205, 118-127.

Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R.D., Bairoch, A., 2003. ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res* 31, 3784-3788.

Gehrke, B., 2011. Synopsis of *Carex* (Cyperaceae) from sub-Saharan Africa and Madagascar. *Botanical Journal of the Linnean Society* 166, 51-99.

Gehrke, B., Martin-Bravo, S., Muasya, M., Luceno, M., 2010. Monophyly, phylogenetic position and the role of hybridization in *Schoenoxiphium* Nees (Cariceae, Cyperaceae). *Molecular phylogenetics and evolution* 56, 380-392.

Glazenapp, J.S., Martins, E.R., Casali, V.W.D., Cruz, C.D., Barbosa, P.B., 2014. Characterization of diversity and genetic structure in natural populations of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville by means of allozyme markers. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 16, 216-224.

Goemoery, D., Comps, B., Paule, L., von Wuehlisch, G., 2013. Allozyme and phenotypic variation in beech (*Fagus sylvatica* L.): Are there any links? *Plant Biosystems* 147, 265-271.

Gonzalez-Sarrias, A., Gromek, S., Niesen, D., Seeram, N.P., Henry, G.E., 2011. Resveratrol Oligomers Isolated from *Carex* Species Inhibit Growth of Human Colon Tumorigenic Cells Mediated by Cell Cycle Arrest. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 8632-8638.

Hedren, M., 2002. Patterns of allozyme and morphological differentiation in the *Carex flava* complex (Cyperaceae) in Fennoscandia. *Nordic Journal of Botany* 22, 257-301.

Heide, O.M., 2004. Environmental control of flowering and sex expression in *Carex flava*. *Physiologia Plantarum* 121, 691-698.

Hinchliff, C.E., Roalson, E.H., 2013. Using Supermatrices for Phylogenetic Inquiry: An Example Using the Sedges. *Systematic Biology* 62, 205-219.

Hipp, A.L., Rothrock, P.E., Roalson, E.H., 2009. The Evolution of Chromosome Arrangements in *Carex* (Cyperaceae). *Botanical Review* 75, 96-109.

- Jaaska, V., Jaaska, V., 1990. Isoenzyme variation in Asian beans. *Botanica Acta* 103, 281-290.
- Janyszek, M., Jagodzinski, A.M., Janyszek, S., Wronska-Pilarek, D., 2008. Morphological variability of *Carex spicata* Huds. utricles among plant communities. *Flora* 203, 386-395.
- Jegorova, T.V., 1999. The sedges (*Carex* L.) of Russia and adjacent states (within the limits of the former USSR). St. Petersburg: St. Petersburg State Chemical-Pharmaceutical Academy.
- Jermey, A.C., Bownas, S., Chater, A.C., David, R.W., 2007. *Sedges of the British Isles*, Edition 3. Botanical Society of the British Isles London.
- Jimenez-Mejias, P., Martin-Bravo, S., Luceno, M., 2012. Systematics and Taxonomy of *Carex* sect. *Ceratocystis* (Cyperaceae) in Europe: A Molecular and Cytogenetic Approach. *Systematic Botany* 37, 382-398.
- Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A., Stevens, P.F., Donoghue, M.J., 2002. *Plant Systematics: a Phylogenetic Approach*, Second Edition, leheküljed 6-39, 95-120 ja 284-286 Sinauer Associates, Inc.
- Kettenring, K.M., Galatowitsch, S.M., 2007a. Temperature requirements for dormancy break and seed germination vary greatly among 14 wetland *Carex* species. *Aquat. Bot.* 87, 209-220.
- Kettenring, K.M., Galatowitsch, S.M., 2007b. Tools for *Carex* revegetation in freshwater wetlands: understanding dormancy loss and germination temperature requirements. *Plant Ecology* 193, 157-169.
- Kull, T., Oja, T., 2007. Low allozyme variation in *Carex loliacea* (Cyperaceae), a declining woodland sedge. *Annales Botanici Fennici* 44, 267-275.
- Kull, T., Oja, T., 2010. Allozyme Diversity and Geographic Variation among Populations of the Locally Endangered Taxon *Carex magellanica* subsp. *irrigua* (Cyperaceae). *Folia Geobotanica* 45, 323-336.
- Kükenthal, G., 1909. Cyperaceae-Caricoideae. *Das Pflanzenreich*, IV 20, 1-824.
- Leck, M.A., Schütz, W., 2005. Regeneration of Cyperaceae, with particular reference to seed ecology and seed banks. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 7, 95-133.
- Lee, S.-W., Ledig, F.T., Johnson, D.R., 2002. Genetic variation at allozyme and RAPD markers in *Pinus longaeva* (Pinaceae) of the White Mountains, California. *American Journal of Botany* 89, 566-577.
- Leht, M., Krall, H., Kukk, T., Kull, T., Kuusk, V., Oja, T., Pihu, S., Reier, Ü., Zingel, H., Tuulik, T., 2010. Eesti taimede määraja - kolmas, parandatud trükk.

Leitner, T., Escanilla, D., Franzen, C., Uhlen, M., Albert, J., 1996. Accurate reconstruction of a known HIV-1 transmission history by phylogenetic tree analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, 10864-10869.

Leveille-Bourret, E., Gilmour, C.N., Starr, J.R., Naczi, R.F.C., Spalink, D., Sytsma, K.J., 2014. Searching for the sister to sedges (*Carex*): resolving relationships in the Cariceae-Dulichieae-Scirpeae clade (Cyperaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 176, 1-21.

Li, L., Henry, G.E., Seeram, N.P., 2009. Identification and Bioactivities of Resveratrol Oligomers and Flavonoids from *Carex folliculata* Seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 7282-7287.

Lipnerova, I., Bures, P., Horova, L., Smarda, P., 2013. Evolution of genome size in *Carex* (Cyperaceae) in relation to chromosome number and genomic base composition. *Annals of Botany* 111, 79-94.

Micales, J.A., Bonde, H.R., 1995. Isozymes: methods and applications in *Molecular Methods in Plant Pathology* (ed. R. P. Singh, & U. S. Singh). CRC Press, Boca Raton, FL., 115-130.

Molina, A., Acedo, C., Llamas, F., 2012. A Comparative Study of the Inflorescence in the Genus *Carex* (Cyperaceae). *Systematic Botany* 37, 365-381.

Mondini, L., Noorani, A., Pagnotta, M.A., 2009. Assessing Plant Genetic Diversity by Molecular Tools. *Diversity* 1, 19-35.

Naczi, R.F., Ford, B.A., 2008. *Sedges: uses, diversity and systematics of the Cyperaceae*. Missouri Botanical Garden Press.

Noyce, G.L., Varner, R.K., Bubier, J.L., Frolking, S., 2014. Effect of *Carex rostrata* on seasonal and interannual variability in peatland methane emissions. *Journal of Geophysical Research-Biogeosciences* 119, 24-34.

Oja, T., 1999. Allozyme diversity and interspecific differentiation of the two diploid brome grass species, *Bromus tectorum* L and *B-sterilis* L (Poaceae). *Plant Biol.* 1, 679-686.

Page, R.D.M., 1996. TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. . *Computer Applications in the Bioscience* 12: 357–358.

Peakall, R.O.D., Smouse, P.E., 2006. GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6, 288-295.

Peakall, R.O.D., Smouse, P.E., 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics* 28, 2537-2539.

Pedajas, H., 2011. PEREKONNA TARN (CAREX) TAKSONOOMILINE JAOTUS JA MITMEKESISUS EESTIS - Bakalaureusetöö.
http://www.botany.ut.ee/kaitsmised_2011/Hedi_Pedajas_baka.pdf (accessed 2015-04-29).

R Core Development Team, 2004. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing.

Rambaut, A., Bogaardt, C., Dudas, G., Fagundes de Carvalho, L., Hall, M., Wikramaratna, P., Bedford, T., Bollback, J., Hedge, J., Lycett, S., Raghwan, J., Welch, J., 2015. Figtree <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/> (accessed 2015-05-21).

Roalson, E.H., 2008. A synopsis of chromosome number variation in the Cyperaceae. *Botanical Review* 74, 209-393.

Roalson, E.H., Columbus, J.T., Friar, E.A., 2001. Phylogenetic relationships in Cariceae (Cyperaceae) based on ITS (nrDNA) and trnT-LF (cpDNA) region sequences: Assessment of subgeneric and sectional relationships in *Carex* with emphasis on section *Acrocystis*. *Systematic Botany*, 318-341.

Roalson, E.H., Friar, E.A., 2004a. Phylogenetic analysis of the nuclear alcohol dehydrogenase (Adh) gene family in *Carex* section *Acrocystis* (Cyperaceae) and combined analyses of Adh and nuclear ribosomal ITS and ETS sequences for inferring species relationships. *Molecular phylogenetics and evolution* 33, 671-686.

Roalson, E.H., Friar, E.A., 2004b. Phylogenetic relationships and biogeographic patterns in North American members of *Carex* section *Acrocystis* (Cyperaceae) using nrDNA ITS and ETS sequence data. *Plant Systematics and Evolution* 243, 175-187.

Simpson, D.A., Muasya, A.M., Alves, M.V., Bruhl, J.J., Dhooge, S., Chase, M.W., Furness, C.A., Ghamkhar, K., Goetghebeur, P., Hodkinson, T.R., 2007. Phylogeny of Cyperaceae based on DNA sequence data—a new rbcL analysis. *Aliso: A Journal of Systematic and Evolutionary Botany* 23, 72-83.

Simpson, D.A., Naczi, R.F.C., Ford, B.A., 2008. Frosted curls to tiger nuts: ethnobotany of Cyperaceae. *Sedges: uses, diversity and systematics of the Cyperaceae*, 1-14.

Sorrie, B., Naczi, R., Ford, B., 2008. Diversity, endemism, and phytogeography of North American Coastal Plain sedges. *Sedges: uses, diversity and systematics of the Cyperaceae*, 103-117.

Starr, J.R., Ford, B.A., 2009. Phylogeny and Evolution in Cariceae (Cyperaceae): Current Knowledge and Future Directions. *Botanical Review* 75, 110-137.

Starr, J.R., Harris, S.A., Simpson, D.A., 2004. Phylogeny of the unispicate taxa in Cyperaceae tribe Cariceae I: Generic relationships and evolutionary scenarios. *Systematic Botany* 29, 528-544.

Starr, J.R., Harris, S.A., Simpson, D.A., 2008. Phylogeny of the unispicate taxa in Cyperaceae tribe Cariceae II: the limits of *Uncinia*. *Monographs in Systematic Botany Missouri Botanical Garden* 108, 243-267.

Stenström, A., Jonsdottir, I.S., Augner, M., 2002. Genetic and environmental effects on morphology in clonal sedges in the Eurasian Arctic. *American Journal of Botany* 89, 1410-1421.

Swofford, D.L., 2003. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Talve, T., Orav, K., Angelov, G., Pihu, S., Reier, U., Oja, T., 2012. Comparative Study of Seed Germination and Genetic Variation of Rare Endemic *Rhinanthus osiliensis* and Related Widespread Congener *R. rumelicus* (Orobanchaceae). *Folia Geobotanica* 47, 1-15.

Tyler, T., 2003. Allozyme variation in *Carex* sect. *Digitatae* - Evidence of introgression, genetic distinctiveness and evolution of taxa. *Plant Systematics and Evolution* 237, 219-231.

Waterway, M.J., Hoshino, T., Masaki, T., 2009. Phylogeny, Species Richness, and Ecological Specialization in Cyperaceae Tribe Cariceae. *Botanical Review* 75, 138-159.

Waterway, M.J., Starr, J.R., 2007. Phylogenetic relationships in tribe Cariceae (Cyperaceae) based on nested analyses of four molecular data sets. *Aliso: A Journal of Systematic and Evolutionary Botany* 23, 165-192.

Wendel, J.F., Weeden, N.F., 1989a. 1 Visualization and interpretation of plant isozymes in *Isozymes in plant biology* (ed. D. E. Soltis & P. S. Soltis). Dioscorides, Portland, OR., 5-45.

Wendel, J.F., Weeden, N.F., 1989b. 2 Genetics Of Plant Isozymes in *Isozymes in plant biology* (ed. D. E. Soltis & P. S. Soltis). Dioscorides, Portland, OR., 46-71.

Yano, O., Ikeda, H., Jin, X.-F., Hoshino, T., 2014. Phylogeny and chromosomal variations in East Asian *Carex*, *Siderostictae* group (Cyperaceae), based on DNA sequences and cytological data. *Journal of Plant Research* 127, 99-107.

Yen, A.C., Olmstead, R.G., 2000. Molecular systematics of Cyperaceae tribe Cariceae based on two chloroplast DNA regions: *ndhF* and *trnL* intron-intergenic spacer. *Systematic Botany* 25, 479-494.

10. Lisad

Lisa 1 – PAUP* käsufaili näidis

```
#nexus      [paup isendi kaupa]
log file=ISENDpaup;
begin taxa;
dimensions ntax=256;
taxlabels   [isendite nimed on eemaldatud] ;
endblock;
begin characters;
dimensions nchar=139;
charlabels   [lookuste nimed on eemaldatud] ;
matrix       [andmemaatriks on eemaldatud] ;
endblock;
showmatrix;
outgroup pulicar181 pulicar183/only;
begin paup;
set autoclose=yes;
set criterion=parsimony;
set increase=auto;
set root=outgroup;
set outroot=monophyl;
set storebrlens=yes;
nj breakties=random brlens=yes;
roottrees;
describetrees /plot=both;
savetrees file=NJrISENDpuu.tre brlens=yes replace=yes;
upgma breakties=random brlens=yes;
describetrees /plot=both;
savetrees file=UPGMARISENDpuu.tre brlens=yes replace=yes;
hsearch /rstatus=yes addseq=random nreps=1000 steepest=yes multrees=no;
roottrees;
describetrees /plot=both;
savetrees file=HeurISENDpuu.tre brlens=yes replace=yes;
cont/majrule file=H100and50consISEND.tre replace=yes;
bootstrap nreps=100 conlevel=50 brlens=yes treefile=B50ISENDtrees.tre replace=yes
search=heuristic/addseq=random nreps=100 steepest=yes multrees=no;
roottrees;
describetrees /plot=both;
savetrees from=1 to=1 file=Boot50ISEND.tre root=yes brlens=yes savebootp=nodelabels
maxdecimals=0 replace=yes;
end;
```

[programmi vaikevalikulised ja seega käsufailis mittekajastuvad parameetrid olid:
opt=acctrans start=stepwise hold=1 swap=TBR usenonmin=no keep=0]

Lookus	Alleel	Distach	Aulcoys	Ceratoc	Chloros	Panicea	Phacocy	Porocys	Racenos	Rhyncho	Spirost	Sylvati	Thuring	Vesicar	Ammoglo	Chordor	Foetida	Heleogl	Ovales	Phaesto	Physogl	Remotae	Vulpina	Totaalne		
EST E	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9,1	-	-	-	-	-	27,3	-	-	-	-	1,2		
	2	100	20,0	2,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	25,0	54,5	-	-	-	-	36,3		
	3	-	20,0	81,4	-	-	-	-	-	-	96,2	-	4,5	100	-	-	-	-	18,2	-	-	-	10,7	16,5		
	4	-	60,0	2,3	-	8,3	-	-	-	-	3,8	-	40,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,3		
	5	-	-	-	100	41,7	50,0	-	-	100	-	-	45,5	-	-	-	-	-	-	-	-	40,9	-	7,0		
	6	-	-	-	-	50,0	50,0	-	100	-	-	100	-	-	50,0	100	100	25,0	-	-	-	-	89,3	18,4		
	7	-	-	-	-	-	-	16,7	-	-	-	-	-	-	50,0	-	-	50,0	-	100	100	59,1	-	15,2		
	8	-	-	-	-	-	-	50,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,1		
	9	-	-	-	-	-	-	33,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,7		
	22	-	-	14,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,4		
MDH A	1	-	-	-	-	-	10,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	66,7	-	-	0,9		
	3	-	-	-	-	10,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	0,7		
	4	-	75,0	9,3	-	-	50,0	100	-	-	61,5	71,4	-	85,7	-	-	-	-	-	23,1	-	-	-	13,9		
	5	-	25,0	90,7	100	90,0	40,0	-	100	100	38,5	28,6	-	14,3	-	-	-	-	-	76,9	33,3	-	100	33,5		
	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30,0	-	-	9,1	-	1,2		
	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20,0	-	41,7	-	-	8,3	70,0	-	-	90,9	-	7,6		
	9	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	58,3	-	100	91,7	-	-	-	-	-	40,1		
	22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	80,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,0		
MDH B	1	-	75,0	16,7	-	-	55,6	-	100	12,5	-	58,3	-	64,3	-	-	-	-	-	-	20,0	-	56,0	13,5		
	2	-	-	50,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16,7	-	-	-	-	5,7		
	3	-	-	9,5	-	-	22,2	77,8	-	-	-	-	100	28,6	-	100	-	-	83,3	67,3	80,0	100	44,0	22,8		
	4	-	-	-	-	100	-	22,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,1		
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	38,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,3		
	7	-	25,0	4,8	-	-	-	-	-	-	23,1	-	-	-	-	-	-	8,3	-	32,7	-	-	-	4,7		
	9	100	-	-	-	-	-	-	-	-	38,5	-	-	-	-	-	-	8,3	-	-	-	-	-	34,9		
	22	-	-	19,0	100	-	22,2	-	-	87,5	-	41,7	-	7,1	100	-	100	83,3	-	-	-	-	-	15,1		
PGD A	1	-	-	-	100	-	5,6	-	-	88,9	-	100	90,0	-	-	-	-	41,7	-	-	-	-	-	9,7		
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	11,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2		
	3	-	80,0	2,3	-	25,0	-	40,0	-	-	-	-	5,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,6		
	5	-	20,0	60,5	-	75,0	38,9	60,0	-	-	16,7	-	-	-	-	-	100	58,3	-	-	100	-	-	14,9		
	7	100	-	2,3	-	-	-	-	-	-	50,0	-	5,0	78,6	100	83,3	-	-	100	100	-	-	100	61,6		
	9	-	-	34,9	-	-	55,6	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,9		
	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16,7	-	-	-	-	-	-	-	0,1		
	22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	33,3	-	-	21,4	-	-	-	-	-	-	-	100	-	5,0		

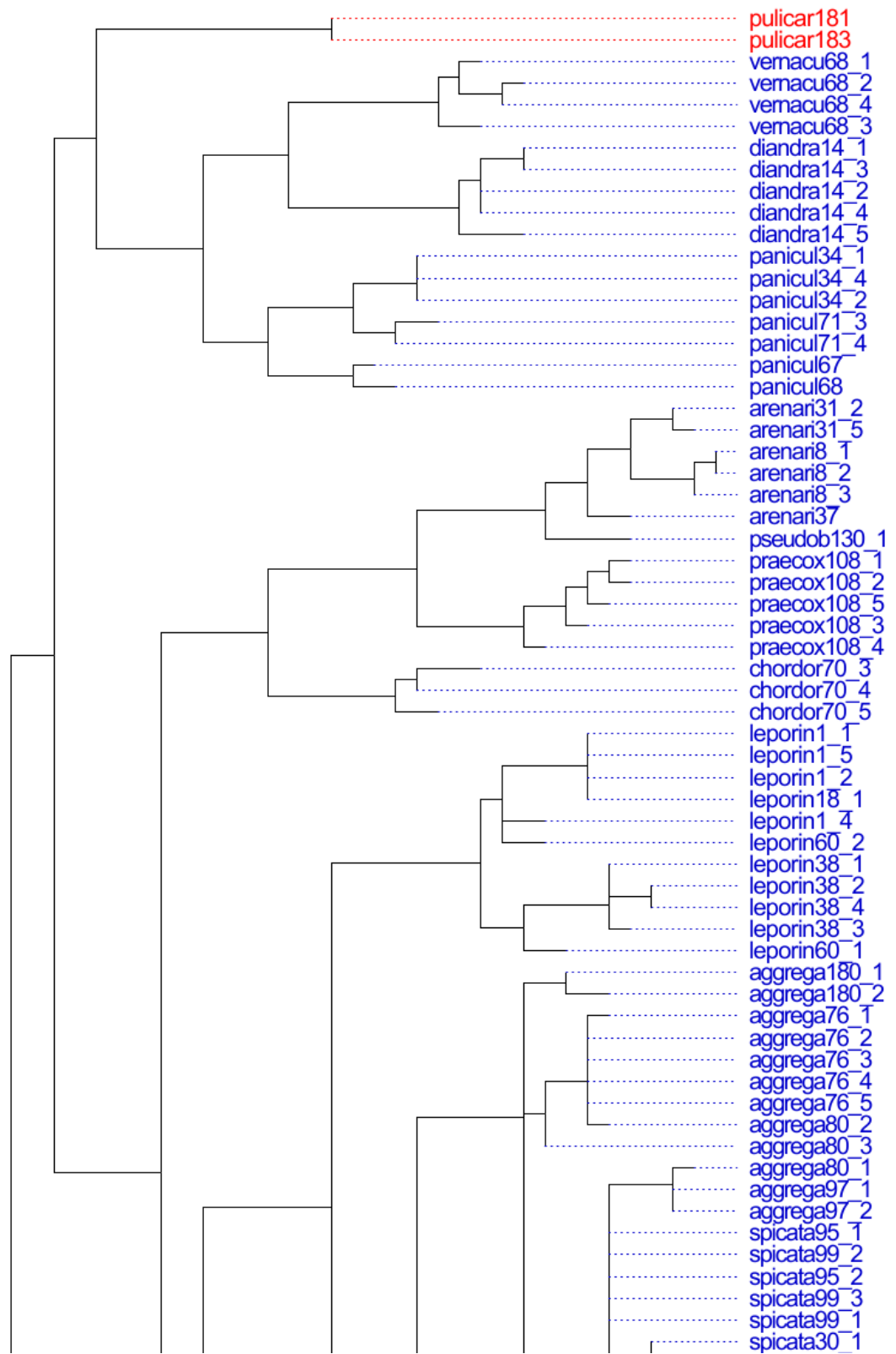
Lookus	Allel	pulcar	fuligin	semperv	flava	hostian	viridul	capilla	panicea	acuta	nigra	pallesc	atrata	pendula	distan	punctat	sylvati	flacca	pseudoc	arenari	praecox	pseudob	chordor	vernacu	diandra	panicul	leporin	aggrega	divulsa	spicata	davalli	remota	cuprina	
AAT A	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	28,6	-		
	2	-	-	-	-	75,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	10	-	-		
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	28,6	-	100	100	100	90,0	71,4	100	
	6	-	-	12,5	-	25,0	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	100	100	100	100	-	100	28,6	-	-	-	-	-	-	-	
	7	-	-	-	-	-	76,9	100	-	-	-	-	-	-	-	87,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12,5	100	-	-	-	-	-	-	-	-	42,9	-	-	-	-	-	-	-	
	9	-	-	-	100	-	23,1	-	100	100	100	-	-	-	100	-	100	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	10	-	100	87,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	22	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
AAT B	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,1	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	12,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	3	-	-	50,0	-	-	-	-	20,0	-	-	100	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	33,3	-	-	-	9,1	-	-	-	-	100	-	
	4	-	-	-	16,7	-	-	-	-	100	85,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	50,0	100	100	90,9	16,7	-	-	-	-	-
	5	100	-	-	-	-	-	-	-	-	7,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	37,5	-	-	-	83,3	100	100	100	-	100	
	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	66,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	8	-	-	-	83,3	100	100	-	40,0	-	-	-	-	100	85,7	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	9	-	100	50,0	-	-	-	-	40,0	-	-	-	-	-	14,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ADH B	1	-	-	-	100	-	-	-	-	50,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	3	100	-	-	-	-	-	-	-	-	85,7	-	-	-	25,0	-	-	-	11,1	44,4	30,0	20,0	50,0	-	-	25,0	-	-	-	-	87,5	-	-	
	5	-	100	50,0	-	100	100	100	100	-	-	100	100	100	62,5	100	100	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	
	6	-	-	25,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14,3	-	-	-	-	-	-	-	-	70,0	80,0	50,0	100	-	-	-	-	100	-	100	12,5	100	100	
	9	-	-	25,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12,5	-	-	-	44,4	-	-	-	-	100	75,0	100	100	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	50,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
IDH B	1	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	80,0	-	-	-	-	-	-	-	-	70,0	-	-	-	-	100	-	-	-	-	100	100	2,8	
	3	-	100	-	45,5	100	-	-	-	-	-	-	-	100	100	100	-	25,0	-	100	10,0	-	100	25,0	80,0	-	-	-	-	100	-	-	-	
	4	-	-	-	54,5	-	100	-	-	-	-	20,0	-	-	-	-	-	-	25,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14,3	-	50,0	-	-	-	-	75,0	75,0	-	20,0	-	-	75,0	20,0	-	100	100	100	-	-	-	97,2	
	6	-	-	-	-	-	-	-	100	100	85,7	-	50,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	7	-	-	100	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	9	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

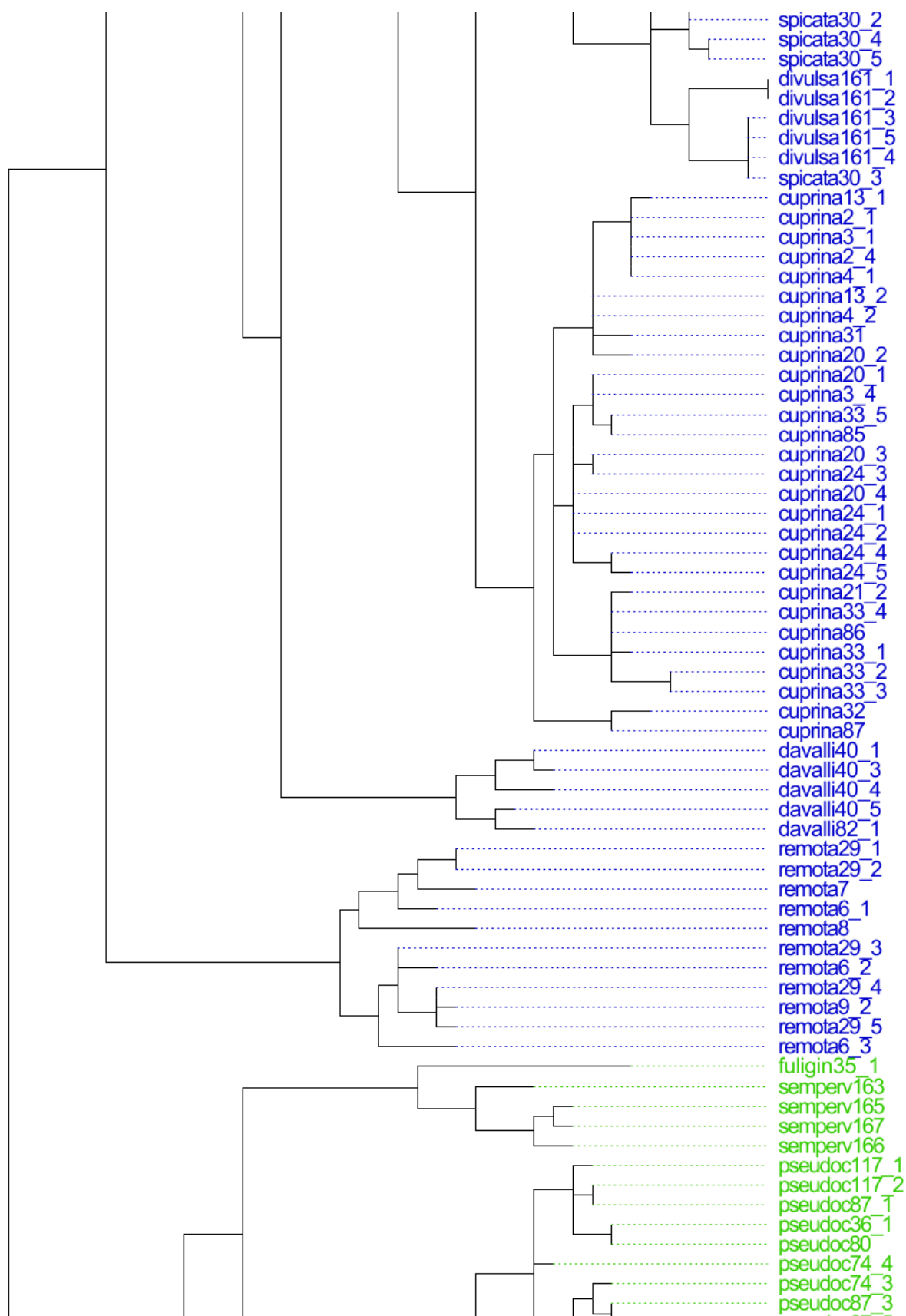
Lookus	Allel	pulcar	fuligin	semperv	flava	hostian	viridul	capilla	panicea	acuta	nigra	palllesc	atrata	pendula	distan	punctat	sylvan	flacca	pseudoc	arenari	praecox	pseudob	chordor	vernacu	diandra	panicul	leporin	aggrega	divulsa	spicata	davalli	remota	cuprina	
EST E	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9,1	-	-	-	-	-	-	-	-	27,3	-	-	-	-	-	-	
	2	100	100	-	6,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	33,3	54,5	-	-	-	-	-	-	
	3	-	-	25,0	93,3	50,0	76,9	-	-	-	-	-	-	-	93,8	100	-	4,5	100	-	-	-	-	-	-	-	18,2	-	-	-	-	-	10,7	
	4	-	-	75,0	-	50,0	-	-	8,3	-	-	-	-	-	6,3	-	-	40,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	5	-	-	-	-	-	-	100	41,7	16,7	64,3	-	-	100	-	-	-	45,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	40,9	-	
	6	-	-	-	-	-	-	-	50,0	83,3	35,7	-	100	-	-	-	100	-	-	25,0	100	-	100	100	100	-	-	-	-	-	-	-	89,3	
	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16,7	-	-	-	-	-	-	-	75,0	-	100	-	-	-	66,7	-	100	100	100	100	59,1	-	
	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	33,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	22	-	-	-	-	23,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MDH A	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	66,7	-	-	
	3	-	-	-	-	-	-	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	4	-	-	100	13,3	100	-	-	-	-	71,4	100	-	-	62,5	60,0	71,4	-	85,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	10,0	-	-	-	
	5	-	100	-	86,7	-	100	100	90,0	100	14,3	-	100	100	37,5	40,0	28,6	-	14,3	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	90,0	33,3	-	100	
	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30,0	-	-	-	-	-	9,1	-	
	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20,0	-	83,3	-	-	-	-	-	14,3	70,0	-	-	-	-	90,9	-	
	9	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16,7	100	100	-	100	100	85,7	-	-	-	-	-	-	-	
	22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	80,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MDH B	1	-	-	100	28,6	-	11,5	-	-	-	83,3	-	100	12,5	-	-	58,3	-	64,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20,0	-	56,0	
	2	-	-	-	-	100	73,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16,7	-	-	-	-	-	-	-	
	3	-	-	-	28,6	-	-	-	-	33,3	16,7	77,8	-	-	-	-	-	100	28,6	-	-	-	100	-	-	83,3	29,2	100	100	80,0	100	44,0	-	
	4	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	22,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	62,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	7	-	100	-	14,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	37,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14,3	-	70,8	-	-	-	-	-	
	9	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	14,3	-	-	-	-	-	-	-	-	
	22	-	-	-	28,6	-	15,4	100	-	66,7	-	-	-	87,5	-	-	41,7	-	7,1	100	100	100	-	100	100	71,4	-	-	-	-	-	-	-	
PGD A	1	-	-	-	-	-	-	100	-	-	8,3	-	-	88,9	-	-	100	90,0	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	3	-	-	100	-	50,0	-	-	25,0	-	-	40,0	-	-	-	-	-	5,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	5	-	100	-	-	-	100	-	75,0	100	8,3	60,0	-	-	12,5	25,0	-	-	-	-	-	-	-	100	-	100	-	-	-	-	100	-	-	
	7	100	-	-	-	50,0	-	-	-	-	-	-	-	-	37,5	75,0	-	5,0	78,6	100	100	100	83,3	-	-	-	100	100	100	100	-	-	100	
	9	-	-	-	100	-	-	-	-	-	83,3	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50,0	-	-	-	21,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	

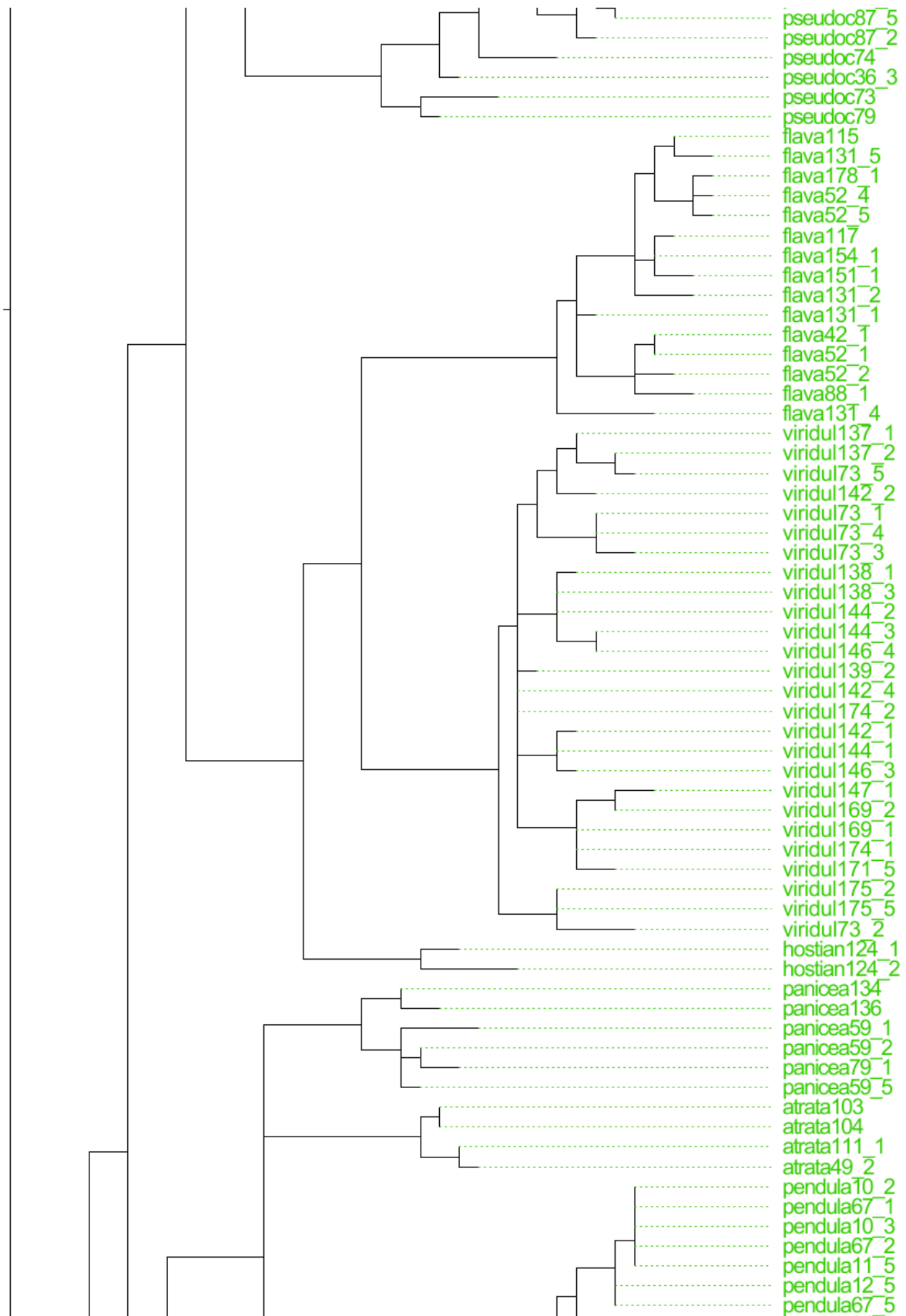
Lookus	Allel	pulicar	fuligin	semperv	flava	hostian	viridul	capilla	panicea	acuta	nigra	pallesc	atrata	pendula	distan	punctat	sylvati	flacca	pseudoc	arenari	praecox	pseudob	chordor	vernacu	diandra	panicul	leporin	aggrega	divulsa	spicata	davalli	remota	cuprina	
PGI A	1	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	100	-	-	-	100	-	64,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	27,3	-	
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	60,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	3	-	-	-	36,7	100	35,7	-	-	-	-	60,0	-	100	-	-	-	77,8	-	40,0	100	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	4	-	100	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	22,2	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	100	-	-	
	5	-	-	-	-	-	64,3	-	-	-	50,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	71,4	-	-	-	-	-	-	-	
	6	100	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	28,6	100	100	100	100	-	-	78,6	
	7	-	-	-	63,3	-	-	-	-	100	50,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	35,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	40,0	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	72,7	21,4	
PGI B	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	40,0	-	-	
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	60,0	9,1	-		
	3	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	75,0	100	100	100	91,7	100	100	-	-	90,9	-	
	4	-	-	-	-	-	15,4	-	100	-	-	-	100	-	100	100	100	-	-	-	-	-	-	25,0	-	-	-	-	8,3	-	-	-	100	
	5	-	-	-	100	25,0	84,6	100	-	-	-	90,0	-	100	-	-	-	68,2	-	83,3	50,0	100	66,7	25,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	6	-	100	100	-	75,0	-	-	-	100	83,3	10,0	-	-	-	-	-	31,8	-	16,7	-	-	33,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	PGM A	1	-	-	-	10,0	-	50,0	50,0	-	-	-	-	37,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3		-	-	-	23,3	25,0	-	-	-	-	50,0	-	-	-	-	-	-	-	38,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	25,0	20,0	35,0	-	-	
4		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20,0	-	-	-	-	-	-	-	-	
5		-	-	100	16,7	-	-	50,0	100	100	12,5	87,5	62,5	-	20,0	100	77,8	100	61,5	-	60,0	-	66,7	-	30,0	-	-	75,0	80,0	65,0	50,0	18,8	14,3	
7		100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	40,0	100	33,3	100	50,0	100	100	-	-	-	50,0	81,3	85,7	
9		-	-	-	50,0	75,0	50,0	-	-	-	-	-	-	-	60,0	-	22,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
15		-	-	-	-	-	-	-	-	-	37,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
19		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
22		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
PGM B	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	12,5	-	-	
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50,0	-	-	
	4	-	100	75,0	76,7	-	30,8	100	100	100	83,3	60,0	100	83,3	66,7	100	89,3	85,7	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	5	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	92,9	-	66,7	-	-	87,5	50,0	-	
	6	-	-	25,0	-	-	-	-	-	-	16,7	40,0	-	16,7	33,3	-	10,7	14,3	-	-	-	-	-	-	100	7,1	-	-	-	-	-	-	-	
	7	-	-	-	-	100	53,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	33,3	100	50,0	-	-	-	84,1	
	9	-	-	-	23,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	33,3	-	100	-	-	-	-	100	33,3	100	50,0	-	-	-	15,9
	22	-	-	-	-	-	15,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	66,7	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

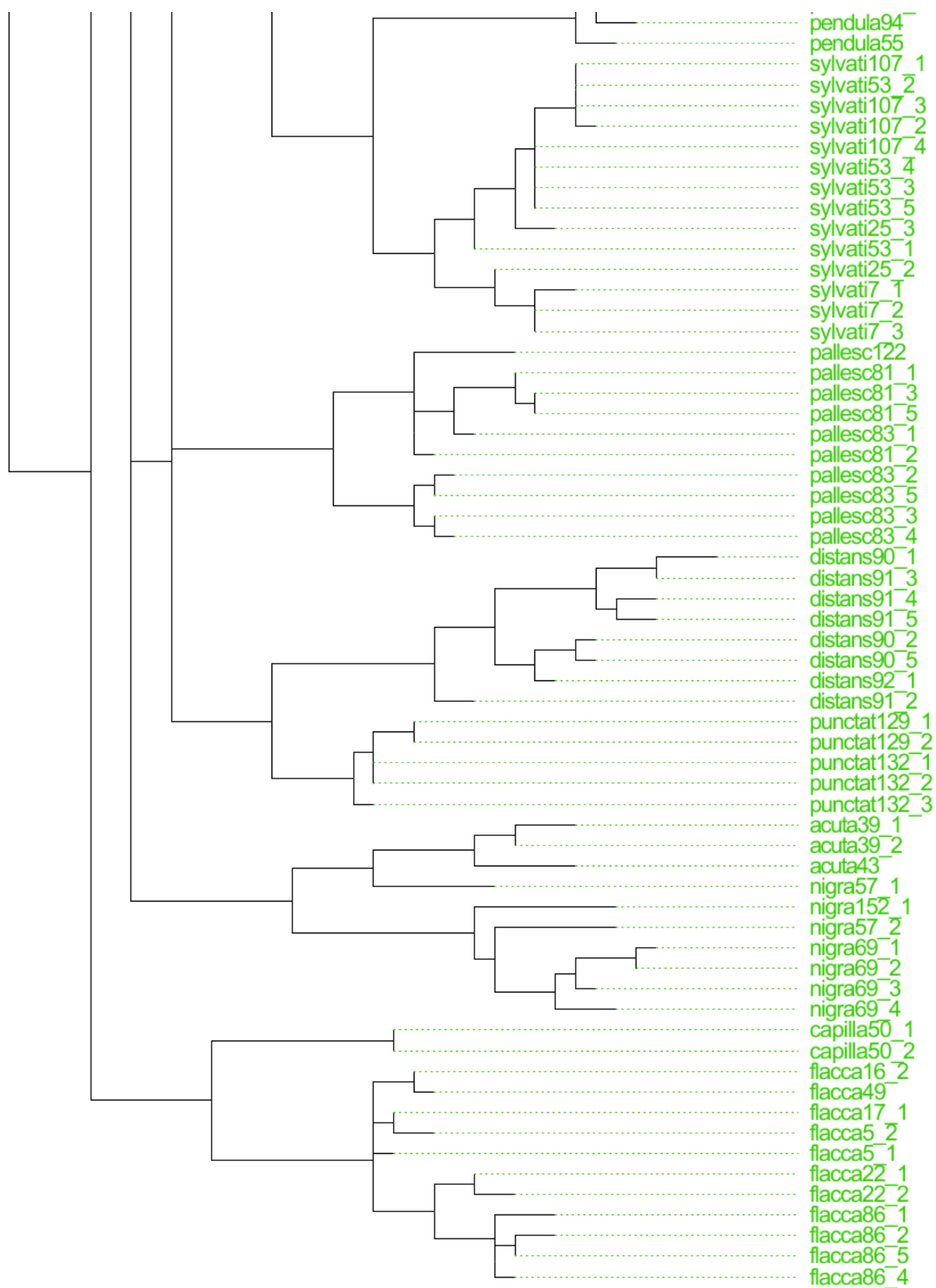
Lookus	Allel	pulcar	fuligin	semperv	flava	hostian	viridul	capilla	panicea	acuta	nigra	pallesc	atrata	pendula	distant	punctat	sylvati	flacca	pseudoc	arenari	praecox	pseudob	chordor	vernacu	diandra	panicul	leporin	aggrega	divulsa	spicata	davalli	remota	cuprina
SKD B	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-
	2	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14,3	-	-	-	-	-	59,1	-
	4	-	-	100	100	75,0	100	-	-	-	-	40,0	-	-	-	-	33,3	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,7
	6	-	-	-	-	25,0	-	-	-	-	14,3	60,0	-	-	-	-	66,7	54,5	-	-	100	50,0	-	100	-	-	20,0	100	100	100	-	40,9	92,3
	8	-	-	-	-	-	-	-	10,0	-	-	-	-	71,4	-	-	-	-	-	100	-	50,0	-	-	-	85,7	80,0	-	-	-	-	-	-
	10	100	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	28,6	-	-	-	45,5	-	-	-	-	100	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-
	12	-	-	-	-	-	-	-	-	16,7	71,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	14	-	-	-	-	-	-	-	90,0	66,7	14,3	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	16	-	-	-	-	-	-	-	-	16,7	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SOD A	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	81,3	-	-	-	-	-	50,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	100	-	-	-	-	-	58,3	-	7,1	100	-	100	18,8	100	100	-	-	100	50,0	100	100	100	100	28,6	100	100	100	100	100	-	100
	4	-	-	-	-	75,0	96,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	-	-	-	66,7	28,6	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	7	-	-	-	-	25,0	-	-	41,7	-	7,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	9	-	-	-	-	-	3,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	33,3	57,1	-	100	-	-	-	-	4,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-
	11	-	-	-	100	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	71,4	-	-	-	-	-	-	-
	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	95,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	22	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SOD B	1	100	-	-	100	100	7,7	-	100	100	14,3	90,0	100	-	-	-	-	22,7	100	100	100	100	-	100	-	-	-	-	-	-	-	68,2	-
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10,0	-	100	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	31,8	-	-
	7	-	-	-	-	-	92,3	100	-	-	71,4	-	-	-	-	-	-	77,3	-	-	-	-	100	-	100	-	100	100	100	100	100	-	100
	22	-	100	100	-	-	-	-	-	-	14,3	-	-	-	100	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SOD C	1	-	-	-	-	-	-	-	8,3	-	-	45,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	75,0	-	-	-	-	-	33,3	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	7	-	100	-	100	100	-	-	91,7	66,7	100	55,0	100	100	100	100	100	100	-	-	100	-	33,3	-	-	42,9	63,6	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	25,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	45,5	-
	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	29,6	-
	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	60,0	-	-
	22	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	100	66,7	-	-	57,1	36,4	100	100	100	40,0	54,5	70,4

Lisa 3 – UPGMA isendipuu

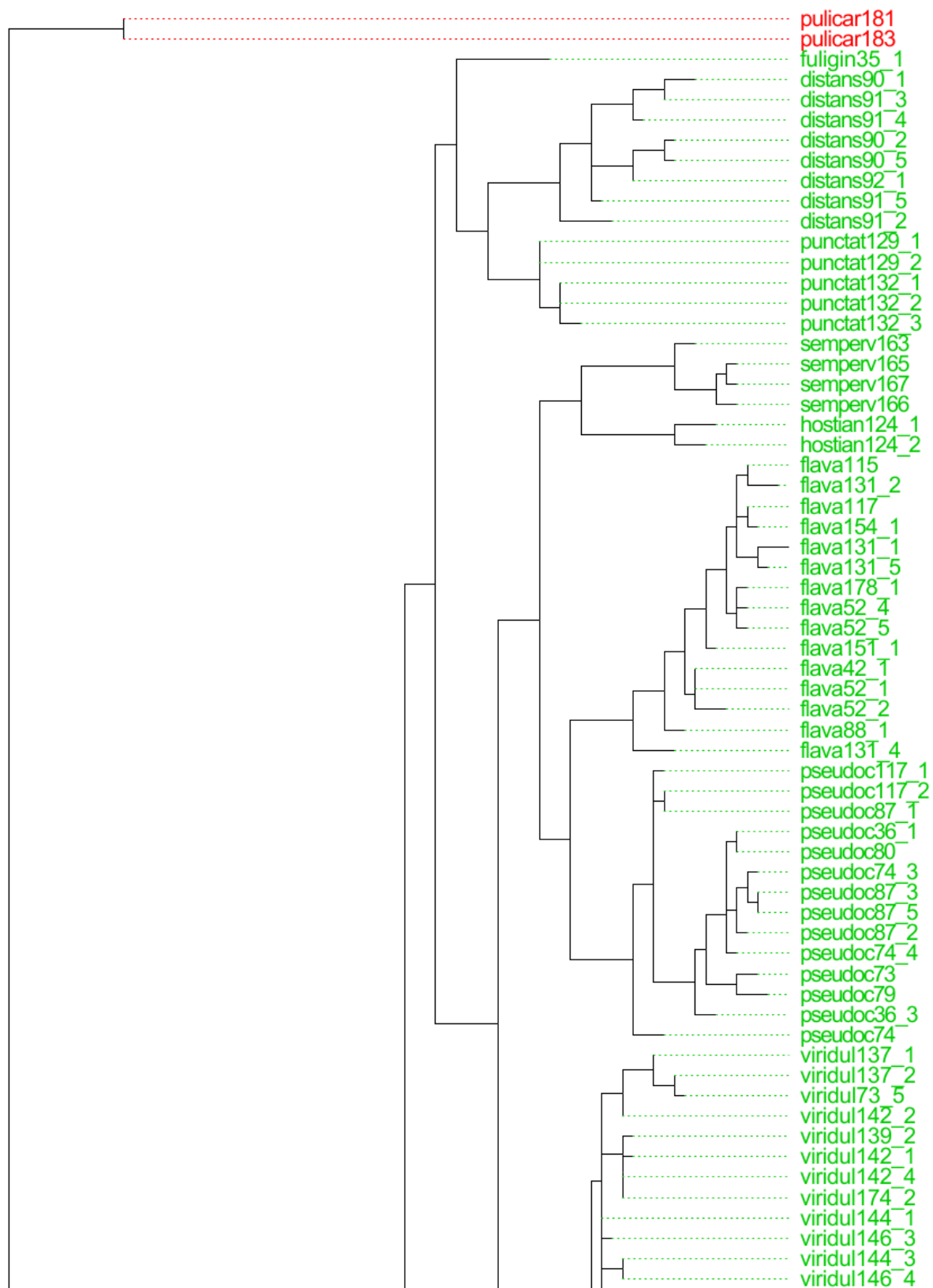


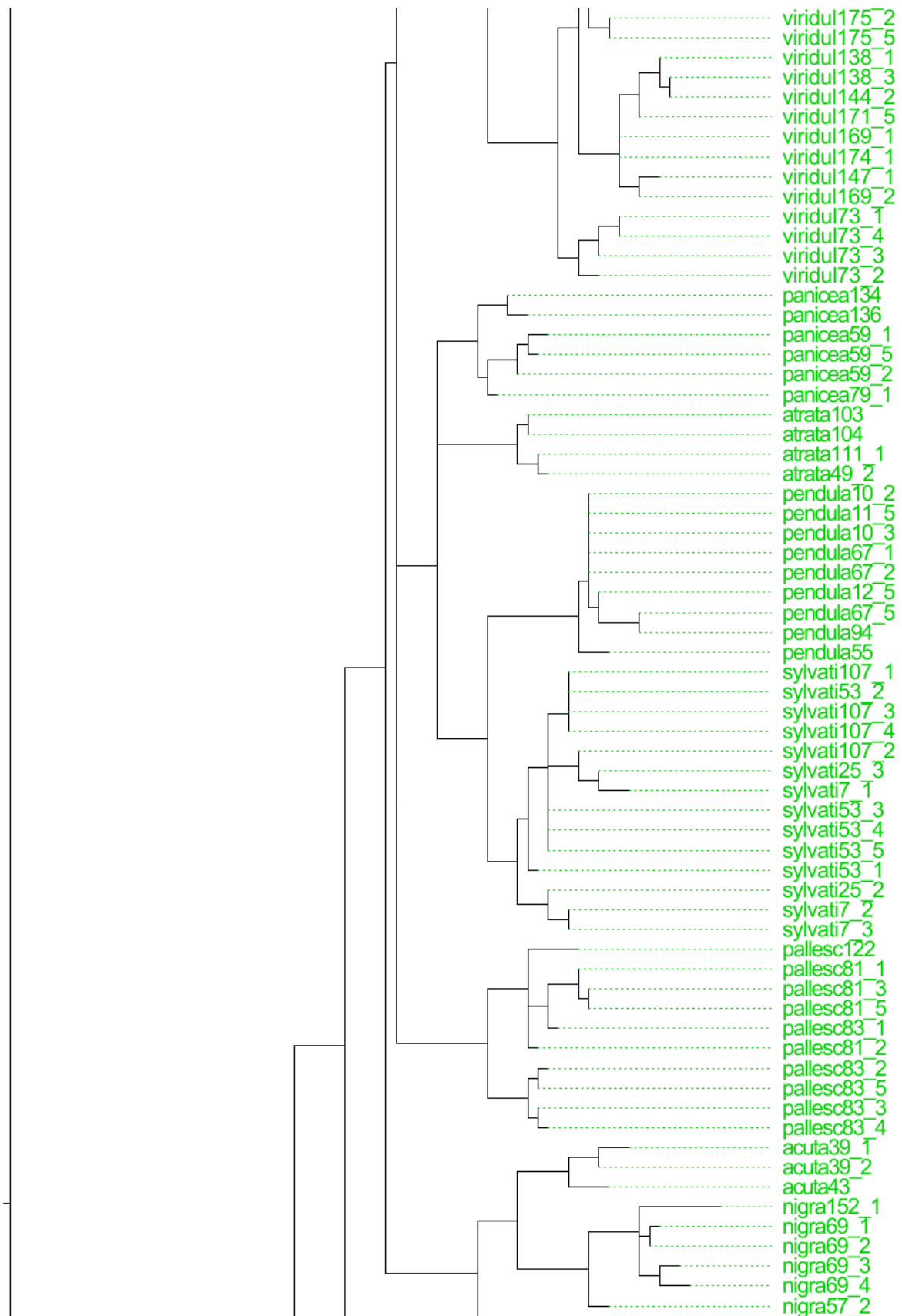


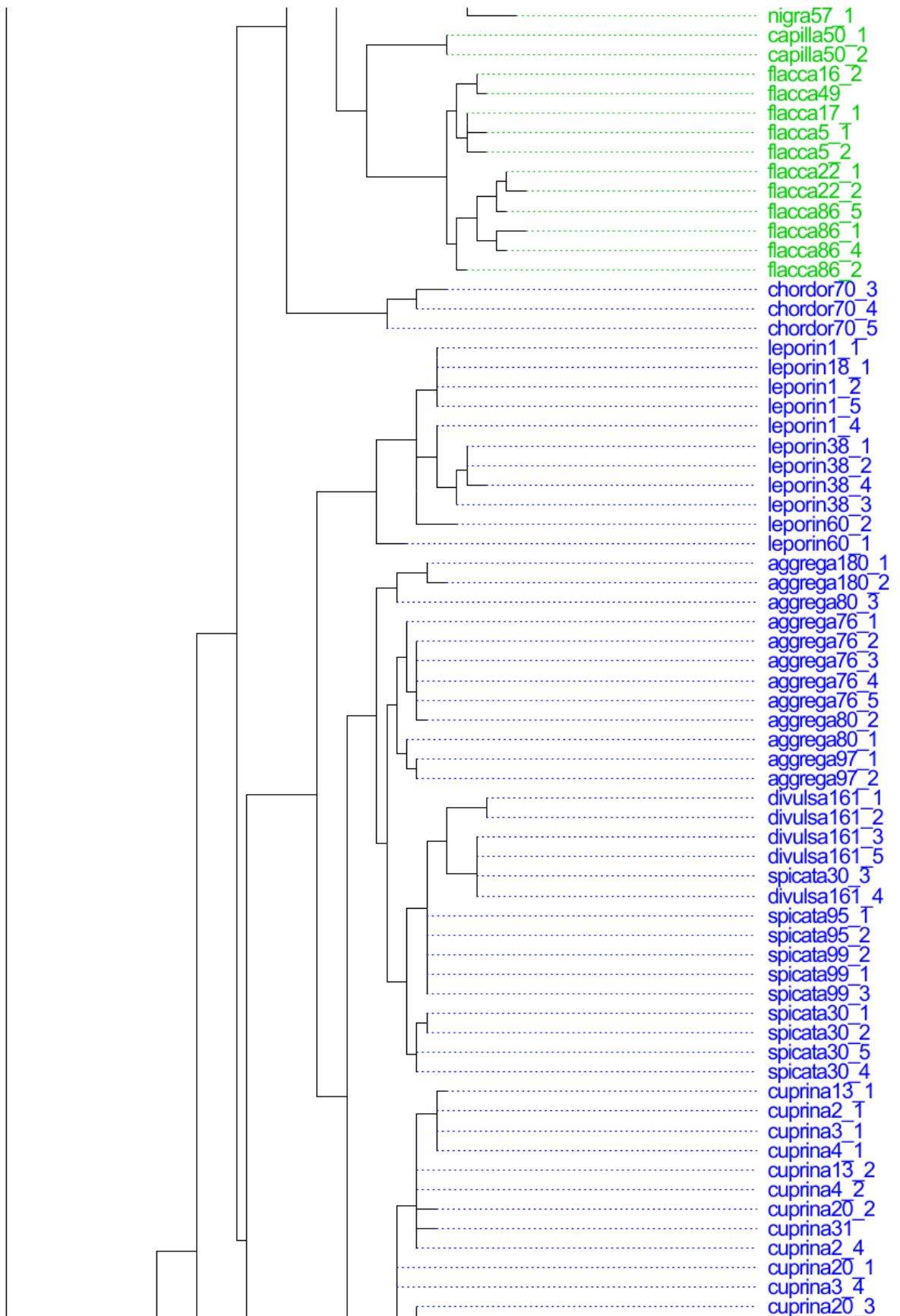


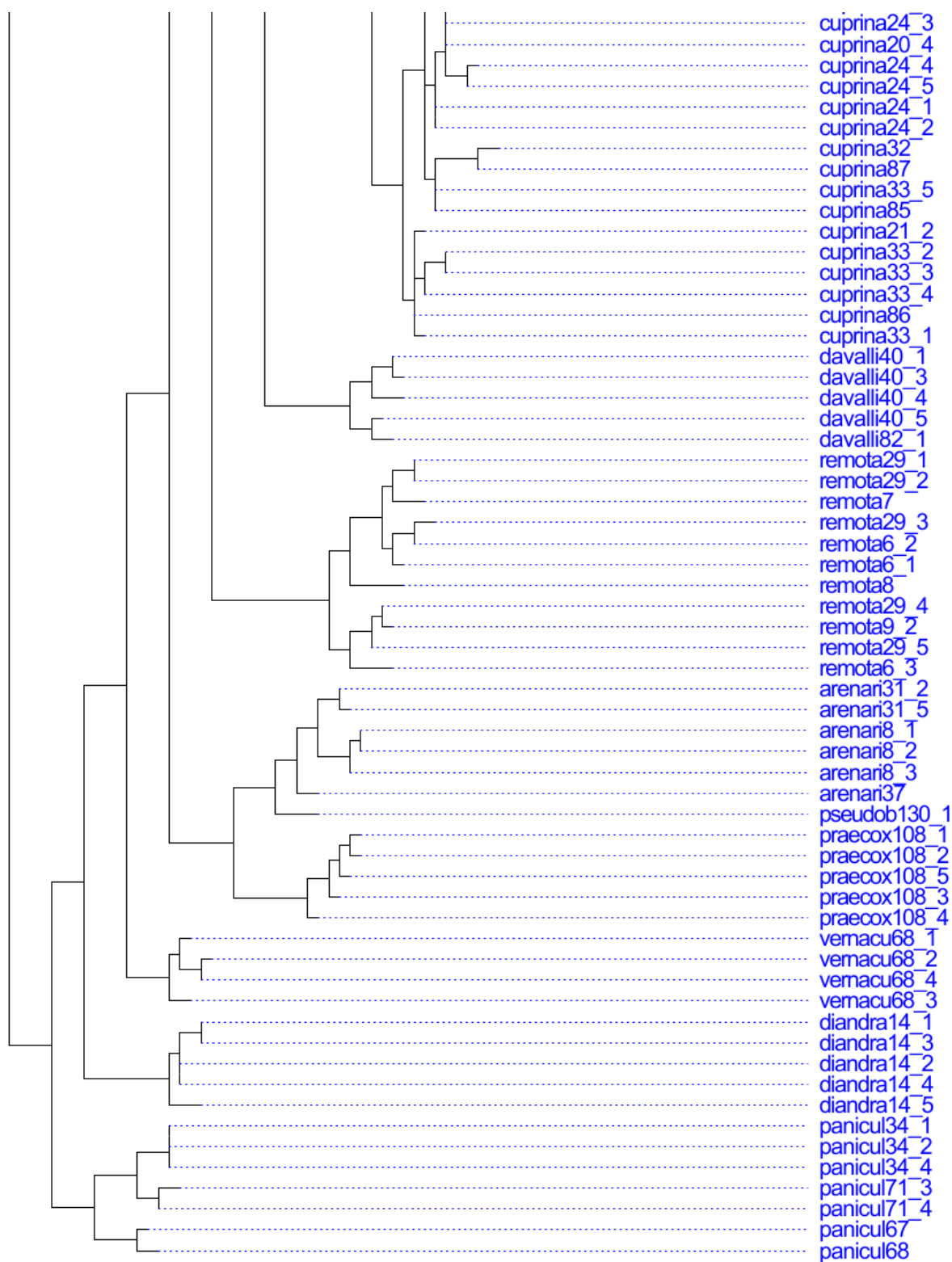


Lisa 4 – NJ isendipuu

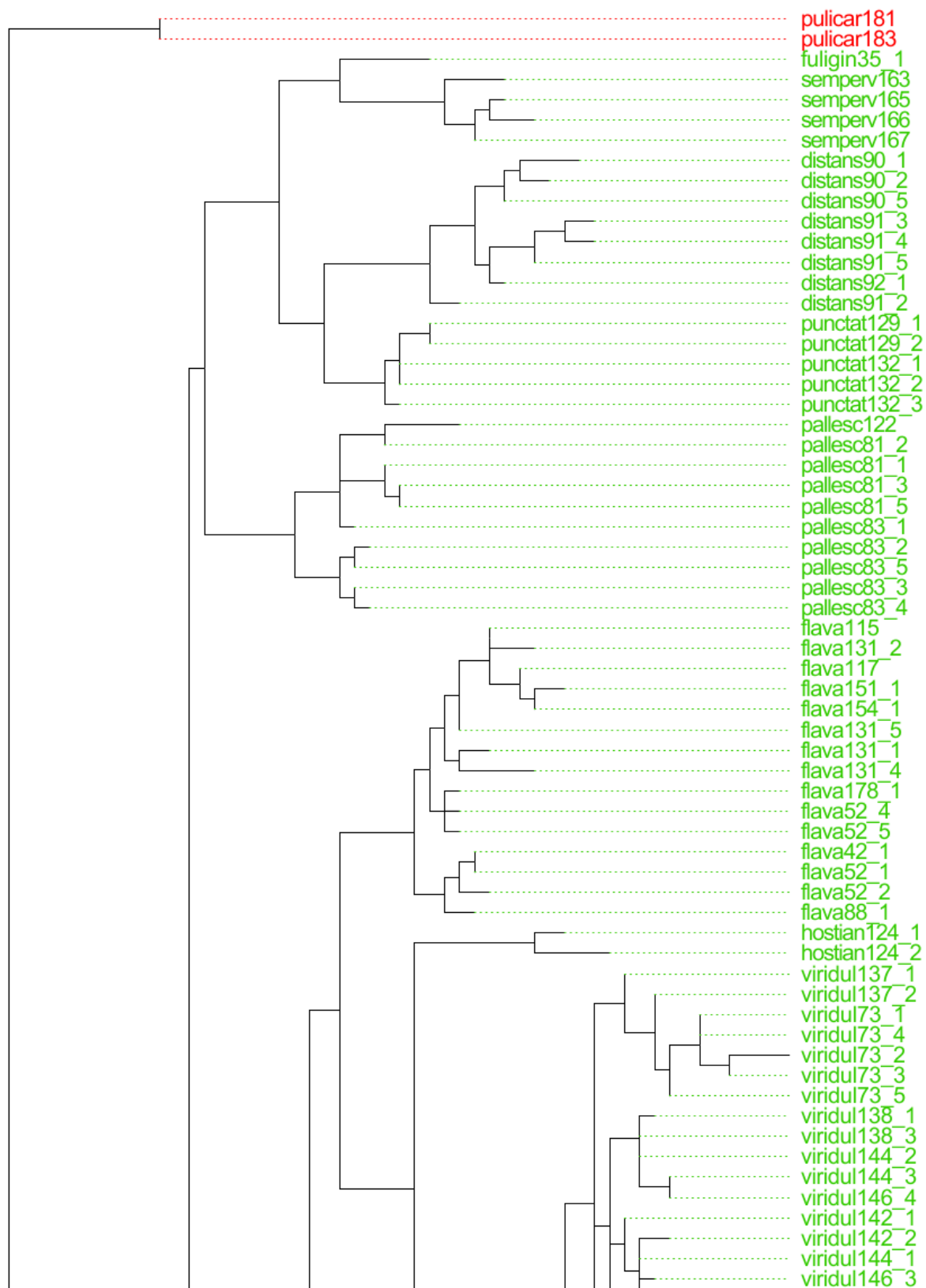


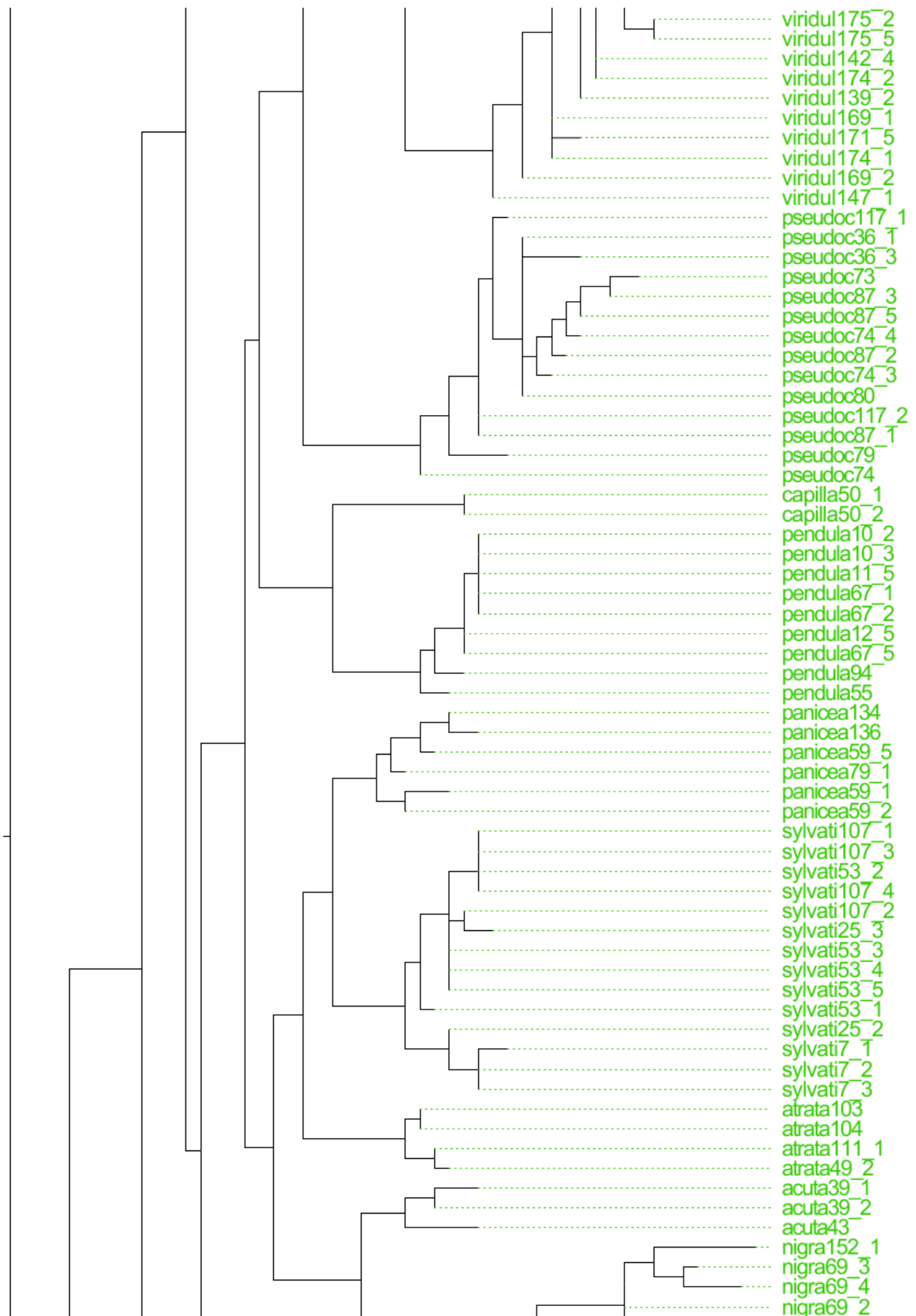


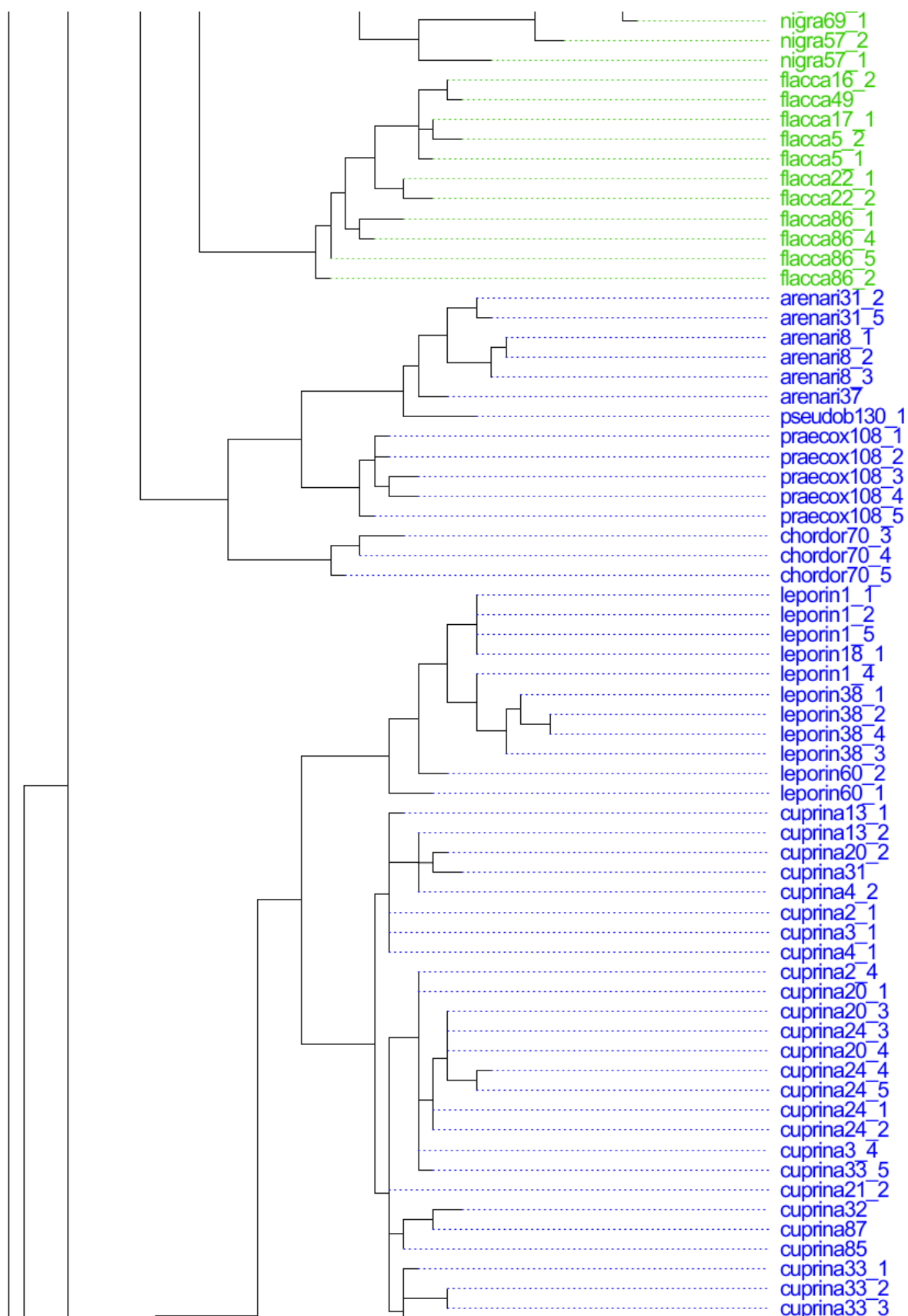


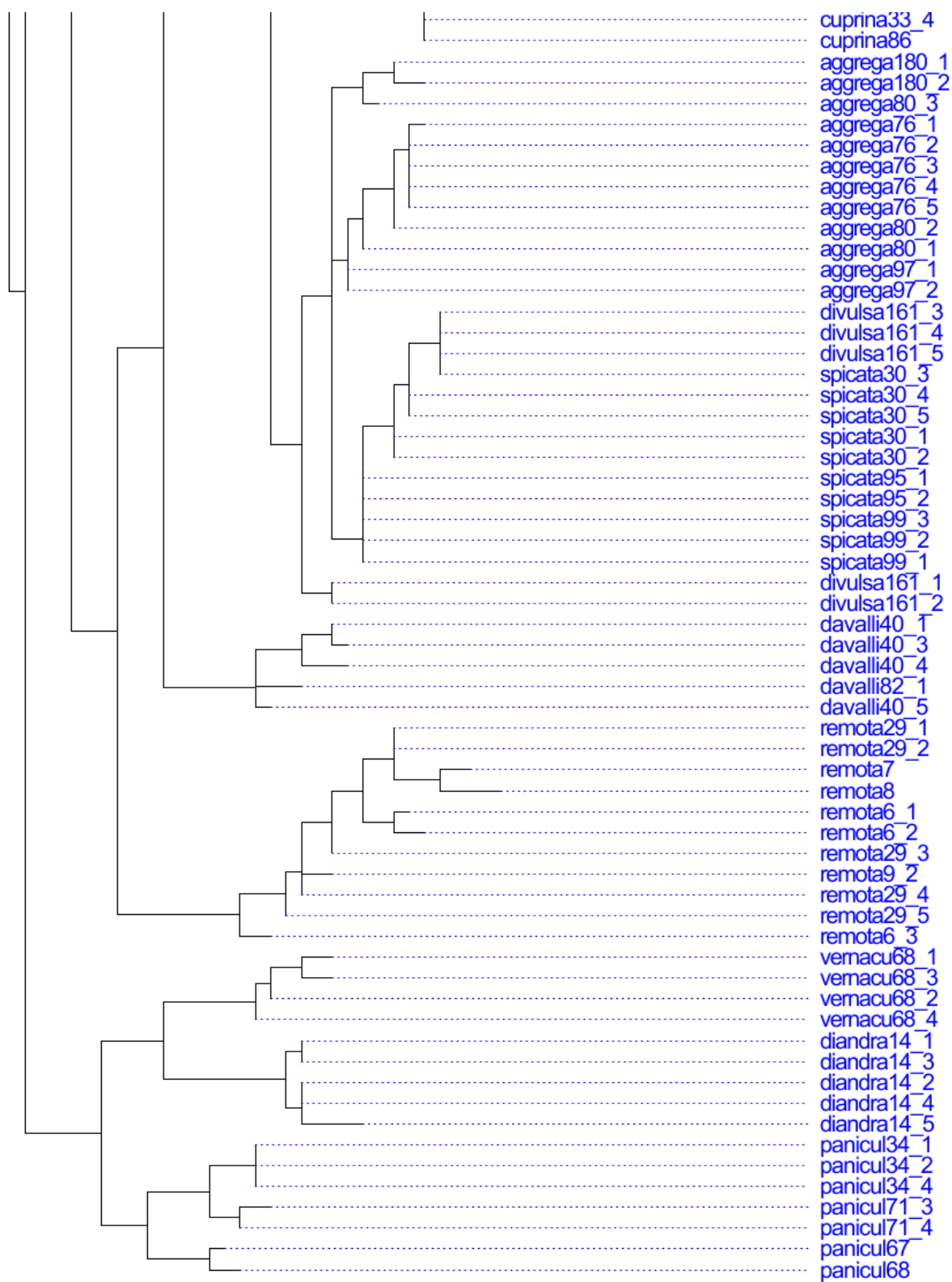


Lisa 5 – Heuristilise otsingu isendipuu









Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Hedi Pedajas (sündinud 15.01.1989),

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

PEREKONNA CAREX LIIKIDE ERISTATAVUS TAKSONOOMILISTEKS SEKTSIOONIDEKS ISOENSÜÜMTUNNUSTE ALUSEL,

mille juhendaja on Tatjana Oja,

- 1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 23.05.2015